UNTERSUCHUNG DES STOFFWECHSELS VON SULFANILAMID UND EINIGEN N-ARYLACETAMIDEN

Wolfgang Fries

1971

UNTERSUCHUNG DES STOFFWECHSELS VON SULFANILAMID UND EINIGEN N-ARYLACETAMIDEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Wolfgang Fries
aus Aschaffenburg am Main

München 1971

1. Berichrerstatter: Prof. Dr. M. Kiese

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-D. Stachel

Tag der mündlichen Prüfung: 9.6.1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Problemstellung 1

B. Die Substanzen, deren Metabolisierung untersucht wurde 5

C. Ergebnisse

C.1. Versuche mit N-Arylacetamiden an Kaninchen 9

C.2. N-Hydroxy-N-(4-chlorphenyl)-acetamid und N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid im Harn von Kaninchen nach deren intraperitonealer Injektion 16

C.3. Metabolite des Sulfanilamids im Harn von Kaninchen nach dessen intraperitonealer Injektion 17

C.4. Versuch zum Nachweis von N-(4-Sulfamoylphenyl)-hydroxylamin als Stoffwechselprodukt von Sulfanilamid bei Kaninchen 22

C.5. Metabolite des Sulfanilamids im Harn des Menschen 23

D. Diskussion 33

E. Zusammenfassung 42

F. Experimenteller Teil

F.1. Materialien 45

F.1.1. Substanzen und Geräte zur Analyse der Metabolite

F.1.2. Synthese bzw. Herkunft der untersuchten Substanzen

F.2. Methoden der Untersuchungen 57

G. Literaturverzeichnis 62

A. PROBLEMSTELLUNG

Fremdstoffe werden im Organismus häufig zu polareren Substanzen metabolisiert. Der Hydroxylierung kommt bei dieser Umsetzung eine wesentliche Bedeutung zu. Hydroxylierte Metabolite entstehen durch Reduktion von Aldehyden zu primären Alkoholen, wie beim Chloral (Trichloracetaldehyd), durch hydrolytische Spaltung von Estern, wie bei der Acetylsalicylsäure, oder durch oxydative Hydroxylierung, wie sie auch bei den hier untersuchten aromatischen Aminen erfolgt.

Unter den Stoffwechselprodukten aromatischer Amine erlangten die N-hydroxylierten Metabolite Bedeutung, als man fand, dass sie die wirksame Substanz bei der Ferrihämoglobinbildung darstellen.

Eine Molekel Phenylhydroxylamin ist in der Lage, eine Vielzahl von Äquivalenten Hämoglobin in roten Zellen zu oxydieren[22]. Bei der Reaktion entsteht Nitrosobenzol, das nach enzymatischer Reduktion wiederum in die Ferrohämoglobinoxydation eingreift - es findet also ein Kreisprozess statt[31].

Der Befund, dass Ferrihämoglobin durch Phenylhydroxylamin in vitro gebildet wird, konnte in vivo bestätigt werden. Wurde der Anstieg von Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol im Blut von Hunden, wie er nach Anilininjektion eintritt, durch i.v. Dauerinfusion von Phenylhydroxylamin erzeugt, war die Geschwindigkeit der Ferrihämoglobinbildung fast identisch mit der nach i.v. Injektion von Anilin, andere Metabolite des Anilins konnten also bei der Oxydation des Anilins nur von untergeordneter Bedeutung sein[30].

Durch den Nachweis von Nitrosobenzol im Blut von Hunden nach i.v. Injektion von Anilin gelang es Kiese[29], erstmals zu zeigen, dass aromatische Amine in vivo am Stickstoff hydroxyliert werden können.

Cramer, Miller und Miller[11] fanden 1960 im Harn von Ratten N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren nach Gabe des carcinogenen 2-Acetylaminofluorens. Dies führte im Verlauf der Entdeckung weiterer N-Hydroxylierungsprodukte als Metabolite carcinogener aromatischer Amine bzw. N-Arylacetamide (Smith und Baldwin[47], Boyland et al.[7], J.A.Miller et al.[44], E.C.Miller et al.[41], Andersen et al.[1]) dazu, dass die o-Hydroxylierungs-Hypothese, die besagte, dass Arylamine ihre Cancerogenität durch Hydroxylierung in o-Position zur Aminogruppe erlangten[10], erheblich an Bedeutung verlor. 2-Acetamidofluoren wird von der Ratte unter anderem zu beiden möglichen o-Phenolen metabolisiert[24], aber diese Metabolite sind, im Gegensatz zu N-Hydroxy-2-acetamidofluoren[40,43], nicht cancerogen[4].

1968 wurde eine neue Metabolisierungsmöglichkeit aromatischer Amine bekannt. V.Jagow, Kiese und Lenk fanden, dass Acetanilide im Organismus zu Glykolaniliden oxydiert werden können[26], ein spezieller Fall von ω-Oxydation. N-(4-Propionylphenyl)-acetamid war von Kaninchen auf diese Weise metabolisiert worden, N-Hydroxylierungsprodukte konnten v.Jagow et al. nicht nachweisen. Es lagen somit Befunde vor, dass N-Arylacetamide (welche das Hauptprodukt der Metabolisierung vieler Arylamine darstellen) entweder bevorzugt am Stickstoff oder am Acetylrest hydroxyliert werden, wobei die Hydroxylierung am Stickstoff zu pharmakologisch hochwirksamen Metaboliten führte.

Es erschien uns daher interessant zu untersuchen, welche Faktoren entscheiden, ob ein N-Arylacetamid am Stickstoff oder am Acetylrest hydroxyliert wird. Zu diesem Zweck wurde der Stoffwechsel einer Reihe von Substanzen beim Kaninchen untersucht. Die Verbindungen sind in Tabelle 1 angegeben, die mit +) versehenen Substanzen wurden von W. Lenk untersucht[17].

Einer dieser Stoffe, N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX) erschien noch aus einem anderen Grunde interessant. Die meisten Tierarten und der Mensch scheiden Sulfanilamid zu einem hohen Anteil als N_4-Acetylderivat aus. Es war zu prüfen, ob dieser Metabolit weiteren biochemischen Umsetzungen unterliegt. Weitere Untersuchungen mit Sulfanilamid schienen auch notwendig, weil nicht bekannt ist, ob Sulfanilamid oder sein N-Acetylderivat N-hydroxyliert werden. Die N-Hydroxylierung ist wahrscheinlich, weil die anderen Metabolite des Sulfanilamids die Bildung von Ferrihämoglobin nach Aufnahme von Sulfanilamid nicht erklären können[23]. Bisher konnte aber N_4-Hydroxysulfanilamid weder im Blut noch im Urin eines Säugers nachgewiesen werden, lediglich nach Inkubation von Lebermikrosomen mit Sulfanilamid wurde dünnschichtchromatographisch eine Substanz mit R_F von N_4-Hydroxybenzolsulfonamid bzw., nach Oxydation, mit R_F von 4-Nitrosobenzolsulfonamid entdeckt, die aber nicht genau identifiziert wurde[48].

Vom Stoffwechsel des Sulfanilamids war, ausser der schon erwähnten Acetylierung am N_4, bekannt, dass es sowohl von Menschen wie auch von Kaninchen zu 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI)[52,53,55] metabolisiert wird. G.Milhaud et al. isolierten

1955 N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV) aus Rattenharn nach Gabe von Sulfanilamid[39] und F.Boyer et al.[5] berichteten 1956, dass sie papierchromatographisch N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid auch im Menschenharn feststellen konnten sowie das an N_1 und N_4 acetylierte Sulfanilamid beim Kaninchen.

Um die Bedeutung der schon bekannten, sowie anderer noch unbekannter Metabolite beim Stoffwechsel des Sulfanilamids einzuschätzen, wurden sie alle in je einem Versuch beim Menschen und bei Kaninchen quantitativ bestimmt.

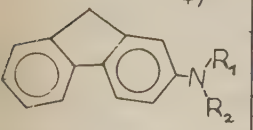
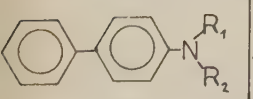
Um die Suche nach den Metaboliten zu erleichtern, wurde ^{35}S-markiertes Sulfanilamid verabreicht.

B. DIE SUBSTANZEN, DEREN METABOLISIERUNG UNTERSUCHT WURDE

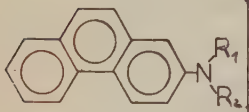
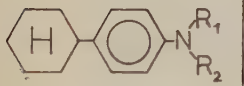
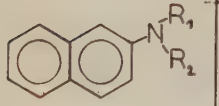
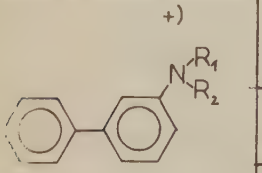
Die Strukturformeln aller Verbindungen, die bei den Stoffwechseluntersuchungen von Interesse waren, sind in Tabelle 1 angeführt. Einige der Substanzen sind käufliche Produkte, einige wurden neu hergestellt (siehe F. Experimenteller Teil).

Tabelle 1 Strukturformeln der untersuchten Substanzen und ihrer Metabolite

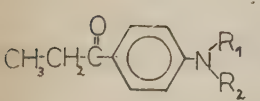
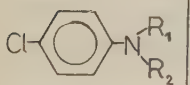
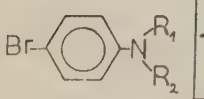
(Die mit +) versehenen Verbindungen wurden von W. Lenk untersucht.)

Allgemeine Formel	R_1	R_2	Verbindung
 +)	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(2-Fluorenyl)-acetamid (I)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(2-Fluorenyl)-glykolamid (II)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(2-fluorenyl)-acetamid (III)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(4-Biphenylyl)-glykolamid (V)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(4-biphenylyl)-acetamid (VI)

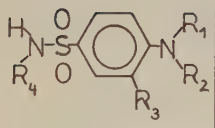
zu Tabelle 1

Allgemeine Formel	R_1	R_2	Verbindung	
+) 	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(2-Phenanthryl)-acetamid	(VII)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(2-Phenanthryl)-glykolamid	(VIII)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(2-phenanthryl)-acetamid	(IX)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid	(X)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(4-Cyclohexylphenyl)-glykolamid	(XI)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid	(XII)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(2-Naphthyl)-acetamid	(XIII)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(2-Naphthyl)-glykolamid	(XIV)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(2-naphthyl)-acetamid	(XV)
+) 	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(3-Biphenylyl)-acetamid	(XVI)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(3-Biphenylyl)-glykolamid	(XVII)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(3-biphenylyl)-acetamid	(XVIII)

zu Tabelle 1

llgemeine Formel	R_1	R_2	Verbindung	
+) 	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(4-Propionylphenyl)-acetamid	(XIX)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(4-Propionylphenyl)-glykolamid	(XX)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(4-propionylphenyl)-acetamid	(XXI)
+) 	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(4-Chlorphenyl)-acetamid	(XXII)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(4-Chlorphenyl)-glykolamid	(XXIII)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(4-chlorphenyl)-acetamid	(XXIV)
+) 	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(4-Bromphenyl)-acetamid	(XXV)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2OH$	N-(4-Bromphenyl)-glykolamid	(XXVI)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-Hydroxy-N-(4-bromphenyl)-acetamid	(XXVII)

zu Tabelle 1

Allgemeine Formel	R_1	R_2	R_3	R_4	Verbindung
	-H	-H	-H	-H	Sulfanilamid (XXVIII)
	-H	-OH	-H	-H	N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-hydroxylamin (XXIX)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	-H	-H	N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-acetamid (XXX)
	-H	$-C-CH_2OH$	-H	-H	N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-glykolamid (XXXI)
	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH$	-H	-H	N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-oxaminsäure (XXXII)
	-OH	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	-H	-H	N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid (XXXIII)
	-H	-H	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(4-Aminobenzol-sulfonyl)-acetamid (XXXIV)
	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	-H	-H	$-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$	N-(4-Acetylamino-benzolsulfonyl)-acetamid (XXXV)
	-H	-H	-OH	-H	4-Amino-3-hydroxy-benzolsulfonamid (XXXVI)

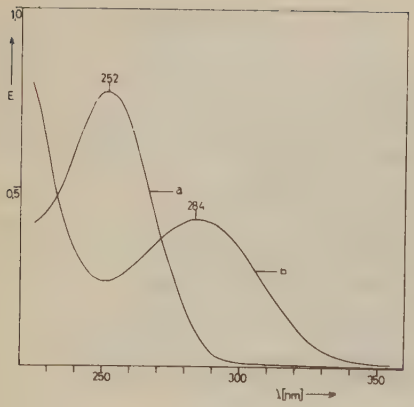
C. ERGEBNISSE

C.1. Versuche mit N-Arylacetamiden an Kaninchen

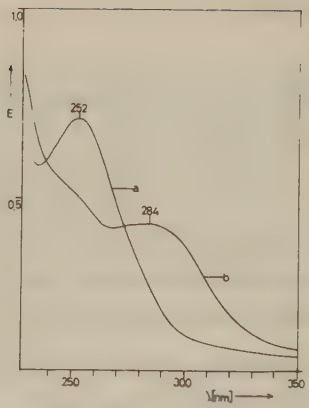
Die nach Verabreichung von 50 mg der N-Arylacetamide je kg aus dem Harn des ersten Tages isolierten Produkte der N- und Essigsäurehydroxylierung sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Zur Berechnung der im Harn ausgeschiedenen Mengen der Metabolite "in Prozent der Dosis" wurden die in Tabelle 3 wiedergegebenen Ergebnisse der Bestimmung der Verluste bei der Isolierung herangezogen.

Im Versuch mit N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid (X) war bei der chromatographischen Auftrennung eine Zone mit R_F des entsprechenden Glykolamids (XI) zu sehen, die in unsauberem Zustand im UV-Spektrum ein λ_{max} von 238 nm hatte im Gegensatz zu 244 nm der synthetischen Substanz. Die weitere Reinigung scheiterte an der geringen Menge. Unter der Annahme, dass Glykolamid vorlag und unter Berücksichtigung der starken Verunreinigung wurde die Menge nach dem quantitativen UV-Spektrum zu 1 mg geschätzt.

N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid (XII) konnte nicht als Kupferkomplex kristallisiert werden, da die Menge zu gering war. Der Identitätsnachweis bleibt hierbei auf den Vergleich der UV-Spektren von synthetischer Substanz und Metabolit beschränkt (Abb. 1).



1.1



1.2

Abb. 1

UV-Spektren von N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid in Methanol; 1.1 synthet. (1,63 mg/100 ml), 1.2 als Metabolit.

a. Neutral in Methanol,

b. nach Zugabe von 0,07 ml 2n NaOH zu 3 ml methan. Lösung.

Nach Gabe von N-(2-Naphthyl)-acetamid liess sich im Urin weder Glykolamid noch Hydroxamsäure nachweisen. Die Zahlen in Kolonne 6 der Tabelle 2 sollen Höchstmengen angeben, die dem Nachweis entgangen sein könnten. Sie wurden nach den Ergebnissen der Versuche über die Wiederauffindung der dem Harn zugefügten Verbindungen ermittelt.

N-(4-Biphenylyl)-acetamid lieferte eine sicher identifizierbare kleine Menge Glykolamid - die entsprechende Oxaminsäure war nicht nachzuweisen - und eine vielfach grössere Menge Hydroxamsäure. Andererseits wurden 5% des N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamids als Glykolamid und ebensoviel als Oxaminsäure gefunden.

Das IR-Spektrum des Metaboliten mit R_F-Wert und UV-Spektrum von N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid wies Abweichungen gegenüber dem des synthetischen Glykolamids auf, wie sie durch Wasser, Ammoniak oder ähnliche Solventien auftreten könnten. Da aber weder nach Umkristallisation aus MeOH noch nach Trocknen bei 120° im Vakuum ein anderes Spektrum zu erhalten war, wurde synthetisches N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid in Urin gelöst und nach derselben Methode isoliert wie die Metabolite. Das anschliessend gemessene IR-Spektrum war identisch mit dem des Metaboliten.

Ein besonderer Reinigungsschritt war notwendig, um das Stoffwechselprodukt mit R_F-Wert und UV-Spektrum von N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure (XXXII) kristallin zu erhalten. Obwohl DC und UV-Spektrum keine Verunreinigung erkennen liessen, war weder aus Methanol, Äthanol, noch aus verschiedenen anderen Lösungsmitteln eine Kristallisation zu erzielen. Schliesslich wurde eine Passage über Sephadex LH-20 durchgeführt. 20 g Sephadex LH-20, gequollen in Methanol, wurden in eine Säule von 1,1 cm Durchmesser und 50 cm Höhe gepackt. Der zu reinigende Metabolit (ca. 15 mg) wurde, in ca. 3 ml Methanol gelöst, auf die Säule gegeben. Mit Methanol wurde bei der Durchflussgeschwindigkeit von ca. 10 ml/5 min eluiert. Im Eluat war der Metabolit von dem Begleitstoff getrennt und liess sich aus Methanol bzw. Äthanol umkristallisieren. Das IR-Spektrum des kristallisierten Stoffwechselprodukts zeigte die Identität mit N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure.

Tabelle 2

Produkte der biochemischen N- und Essigsäurehydroxylierung, bestimmt im Harn, der von Kaninchen während 24 Stunden nach Verabreichung von 50 mg verschiedener N-Arylacetamide je kg ausgeschieden wurde.

Substanz	Zahl der Kaninchen	Dosis mg	Urin in 24 h ml	Glykolamid [Oxaminsäure] aus Harn isoliert *) mg	% der Dosis	Identifiz.	N-Hydroxyacetamid aus Harn isoliert *) mg	% der Dosis	Identifiz.
N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV)	5	627 p.o.	630	2,3	0,5	RF,UV IR	16,5	6,9	RF,UV IR des Cu-Komplexes
N-(4-Cyclohexyl-phenyl)-acetamid (X)	4	567 p.o.	665	(~1)	(0,2)	RF	3,5	1,5	RF, UV neutral alkalisch
N-(2-Naphthyl)-acetamid (XIII)	5 3	732 p.o. 505 p.o.	650 380	0 0	<0,05 <0,05		0 0	<0,1 <0,2	
N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-acetamid (XXX)	4	720 i.p.	375	39,4 [25,2]	5,4 [5,0]	RF,UV,IR RF,UV,IR	0	<0,3	

*) korrigiert nach den Ergebnissen der Verlustbestimmung (Tab.3), dabei wurden von N-(4-Biphenylyl)-glykolamid 72%, von N-Hydroxy-N-(4-biphenylyl)-acetamid 35%, von N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid 40%, von N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid 95% und von N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure 62% wiedergewonnen.

Tabelle 3

Bestimmung der Verluste, die bei Freisetzung und Isolierung der Produkte der biochemischen N- und Essigsäurehydroxylierung von Sulfanilamid und N-Arylacetamiden eintreten. Die synthetischen Metabolite wurden dem Harn zugesetzt (die Mengen richteten sich nach den Metabolitkonzentrationen, die in 0-24 h-Portionen der Versuchsreihen bestimmt worden waren) und der gesamten Prozedur der Freisetzung und Isolierung unterworfen.

Substanz	zugegeben	zu Urin	inkubiert mit Glucuronidase	wiedergewonnen	
	mg	ml	h	mg	%
N-(4-Biphenylyl)-glykolamid (V)	1,8	200	14	1,3	72
N-(4-Cyclohexylphenyl)-glykolamid (XI)	1,0	310	14	0,99	97
N-(2-Naphthyl)-glykolamid (XIV)	0,6	325	16	0,44	72
N-(4-Sulfamoyl)-phenyl)-glykolamid (XXXI)	39,6	100	6	37,4	95
N-Hydroxy-N-(biphenylyl)-acetamid (VI)	5,4	200	14	1,9	35
N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid (XII)	1,8	250	16	0,7	40

zu Tabelle 3

Substanz	zugegeben mg	zu Urin ml	inkubiert mit Glucuronidase h	wiedergewonnen mg	wiedergewonnen %
N-Hydroxy-N-(2-naphthyl)-acetamid (XV)	1,9	300	16	0,8	43
	1,9	245	5	1,2	64
N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid (XXXIII)	2,3	100	14	0	0
	2,3	100	6	11	48
N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure (XXXII)	5,5	100	6	3,4	62
N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXV)	1,1	100	6	0,6	53
N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX)	36,9	100	6	36,9	100
N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV)	1,1	100	6	0,33	30
4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI)	7,2	100	6	5,6	78
Sulfanilamid (XXVIII)	55,4	100	6	42,5	84

Tabelle 4

N-Hydroxy-N-(4-chlorphenyl)-acetamid (XXIV) und N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid (XXXIII) im Harn von Kaninchen nach intraperitonealer Injektion dieser Amide.

Substanz	Dosis			Hydroxamsäure im Harn		ausgeschieden in
	mg/kg	mg		mg	% der Dosis	Stunden
N-Hydroxy-N-(4-chlorphenyl)-acetamid	50	145	i.p.	6,2	4,3	70
	10*)	30	i.p.	13,4	44,7	72
	5**)	33	i.p.	9,1	27,7	24
N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid	10*)	75	i.p.	23,5	31,3	24
	5***)	37,5	i.p.	0		24

*) 3 mal 3,3 mg/kg im Abstand von 3 Stunden
**) 5 mal 1,0 mg/kg im Abstand von 2 Stunden
***) 3 mal 1,65mg/kg im Abstand von 3 Stunden

C.2. N-Hydroxy-N-(4-chlorphenyl)-acetamid (XXIV) und N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid (XXXIII) im Harn von Kaninchen nach deren i.p. Injektion

Die geringe Konzentration an N-Hydroxylierungsprodukten im Harn bzw. das völlige Fehlen beim N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid und die geringe Ausbeute an Glykolamid beim N-(4-Biphenyl)-acetamid beweisen nicht, dass diese Metabolite nur in entsprechend kleiner Menge bzw. gar nicht gebildet werden. Sie könnten auch infolge weiteren Umbaus im Harn nicht oder in nur kleinen Mengen auftreten.

Um zu prüfen, in welchem Ausmass mit biochemischen Veränderungen von Hydroxamsäuren zu rechnen ist, haben wir Kaninchen N-Hydroxy-N-(4-chlorphenyl)-acetamid bzw. N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid in kleinen Dosen im Abstand von mehreren Stunden injiziert. Wiederholte kleine Dosen wurden gewählt, um den Anfall der N-Hydroxyderivative im Stoffwechsel der Amine nachzuahmen und das Auftreten hoher Konzentrationen, die bei der Hydroxylierung der Amine nicht vorkommen, zu vermeiden.

Tabelle 4 zeigt das Ergebnis dieser Unteruchung. Der Versuch, bei dem eine grosse Dosis N-Hydroxy-N-(4-chlorphenyl)-acetamid injiziert und nur 4% der Dosis im Harn gefunden wurde, und die Ergebnisse der Versuche, bei denen kleine Dosen injiziert wurden, zeigten, dass die Menge Hydroxamsäure im Harn nicht dem Anfall im Organismus proportional ist.

C.3. Metabolite des Sulfanilamids im Harn von Kaninchen nach intraperitonealer Injektion

Zwei Kaninchen (3760 bzw. 3750 g) wurden zusammen 360 mg nichtmarkiertes Sulfanilamid (= 50 mg/kg), sowie 17,17 mg ^{35}S-markiertes Sulfanilamid mit einer Radioaktivität von $9{,}631 \cdot 10^8$ dpm i.p. injiziert.

Schon in den ersten 24 Stunden wurden 83,7% der verabreichten Radioaktivität im Urin ausgeschieden, am zweiten Tag 4,0% und am dritten 0,2%. Insgesamt wurden 88,0% der verabreichten Radioaktivität im Urin wieder gefunden.

Die quantitative Bestimmung der Metabolite ergab, dass nach einer einmaligen Inkubation des Harns von 6 Stunden mit Sigma-ß-Glucuronidase, viermaliger Extraktion bei pH 6,0 und dreimaliger Extraktion bei pH 1,7 mit Äthylacetat schon der nach diesem Verfahren höchstmögliche Wert erreicht wurde. Die danach noch im Urin feststellbare Radioaktivität, im Harn des ersten Tages 5,1% der verabreichten Dosis, liess sich auch durch längere Inkubation mit ß-Glucuronidase, Aryl-Sulfatase und daran anschliessende Extraktion nicht verringern. Die Aufarbeitung des Urins mit dieser "REST-RADIOAKTIVITÄT" ist eigens beschrieben.

Die Trennung des bei pH 6,0 gewonnenen Extraktes ergab auf der Dünnschichtplatte 4 radioaktive Zonen von sehr unterschiedlicher Intensität. Nach den R_F-Werten musste es sich hierbei handeln um Sulfanilamid (XXVIII), N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX),

N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid (XXXI) und um N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXV).

Während sich die Identität des Sulfanilamids, des N_4-Acetamids und des N_4-Glykolamids durch Vergleich von R_F-Wert und UV-Spektrum mit den bei der N-Arylacetamidreihe isolierten Metaboliten bestätigen liess, war dies beim N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid zunächst nicht möglich. Eine Trennung an Sephadex LH-20 brachte die erforderliche Reinigung. Da die Menge dieses Metaboliten für eine Kristallisation und IR-Messung zu gering war, bleibt der Identitätsnachweis auf den Vergleich des UV-Spektrums des Metaboliten mit dem der synthetischen Substanz beschränkt. Die Spektren sind identisch mit den bei der Beschreibung des Versuchs mit einem Menschen wiedergegebenen.

Die Trennung des bei pH 1,7 enthaltenen Extraktes ergab auf der Dünnschichtplatte bei der Messung der Radioaktivität, dass neben Spuren des N_4-Acetamids und N_4-Glykolamids die Zone mit R_F der N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure (XXXII) aktiv war. Auch hier liess sich durch Vergleich von R_F-Wert und UV-Spektrum mit dem bereits in der N-Arylacetamidreihe isolierten Metaboliten die Identität nachweisen.

Tabelle 5

Sulfanilamid (XXVIII) und seine Metabolite, isoliert aus dem Harn von Kaninchen nach intraperitonealer Injektion von 50 mg Sulfanilamid/kg, Inkubation des Harns mit Glucuronidase und Extraktion mit Äthylacetat.

Zeit in Std.	Sulfanilamid (XXVIII)		N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX)		N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid (XXXI)		N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXV)		N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure (XXXII)		Summe der Metabol.	Radioaktivität % der Dosis	
	mg	% der Dosis *)	mg	% der Dosis	mg	% der Dosis *)	mg	% der Dosis *)	mg	% der Dosis *)	% der Dosis	gesamt	nicht extrahiert
0-24	14,6	4,6	209,5	44,7	90,7	18,9	4,2	1,4	45,3	13,7	82,6	83,7	5,1
24-48	-		10,1	2,2	5,6	1,2	-		2,7	0,8	4,2	4,0	0,3
	14,6	4,6	219,6	46,9	96,3	20,1	4,2	1,4	48,0	14,5	86,8	87,7	5,4

*) korrigiert nach den Ergebnissen der Verlustbestimmung (Tabelle 3).

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die aus den Äthylacetatextrakten isolierten Metabolite.

Die Daten der Tabelle 5 geben wiederum die Mengenangaben "in Prozent der Dosis" korrigiert für die Verluste bei der Isolierung an.

Auffällig ist der hohe Anteil an Hydroxylierungsprodukten des Acetylrestes (20% Glykolamid und 14% Oxaminsäure), während unverändertes Sulfanilamid nur zu 4,6% bestimmt wurde. Der Wert des N_4-Acetylierungsproduktes (47%) liegt in erwarteter und bekannter Grössenordnung[15]. Das an N_1 und N_4 acetylierte Sulfanilamid erreicht einen Anteil von 1,4% der Dosis.

Zur Untersuchung des Urins mit der "REST-RADIOAKTIVITÄT" - 5,1% der verabreichten Dosis an Radioaktivität waren aus der 0 - 24^h Portion nicht extrahierbar - wurde zunächst eine Urinprobe zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen, die methanol. Lösung auf eine DC-Platte aufgetragen und das Chromatogramm mehrmals mit den Fliessmitteln $CHCl_3$:MeOH (75:25) und Äthylacetat:Methanol:50% Essigsäure (80:5:1) entwickelt. Die anschliessende Radioaktivitätsmessung mit dem Scanner ergab drei aktive Zonen: eine mit R_F-Wert wie Sulfanilamid, die beiden anderen wesentlich polarer. Die UV-Messung in MeOH bestätigte das Sulfanilamid, die beiden anderen Zonen waren zu sehr verunreinigt, um ein auswertbares Spektrum zu ergeben. Eine der beiden Komponenten konnte nach demselben Verfahren, wie im Humanversuch beschrieben, als ein Konjugat von 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI) identifiziert werden.

Eine quantitative Angabe liess sich wegen der zu geringen Konzentration bei diesem Versuch nicht machen. In einem eigens zur Bestimmung des 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamids durchgeführten weiteren Versuch wurden 5 Kaninchen 830 mg Sulfanilamid (50 mg/kg) i.p. injiziert und der in 0 - 24^h gesammelte Urin zur quantitativen Bestimmung des 4-Amino-3-hydroxy-benzol-sulfonamids aufgearbeitet. Es wurden hierbei 7,55 mg bestimmt, was 1,1% der Gesamtdosis entspricht. Berücksichtigt sind hierbei wiederum die Verluste bei der Isolierung (78% der eingesetzten Probe konnten bestimmt werden, siehe Tab. 3), die allerdings nur den Anteil erfassen, der nach der Isolierung des Konjugats eintritt.

C.4. Versuch zum Nachweis von N-(4-Sulfamoylphenyl)-hydroxylamin (XXIX) als Stoffwechselprodukt von Sulfanilamid bei Kaninchen

Da bei der im vorigen Abschnitt beschriebenen Untersuchung N_4-hydroxyliertes Sulfanilamid im Harn nicht nachgewiesen werden konnte, wurde in einem anderen Experiment mit nichtmarkiertem Sulfanilamid ein erneuter Versuch unternommen.

4 Kaninchen wurden 50 mg/kg Sulfanilamid i.p. injiziert. Vier Stunden nach Applikation wurde der in gekühlten Gläsern aufgefangene Urin auf pH 4,5 eingestellt und nach Jagow et al.[28] zur Hälfte 2 Stunden unter Stickstoffzuleitung bei 37° inkubiert. Der Ätherextrakt, der nach Inkubation, Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat (III) und Reinigen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung erhalten wurde, ergab ein UV-Spektrum, das keinerlei Ähnlichkeit mit dem Spektrum des 4-Nitrosobenzolsulfonamids hatte.

Im Modellversuch war zunächst N-(4-Sulfamoylphenyl)-hydroxylamin in Acetatpuffer pH 4,5 mit Kaliumhexacyanoferrat (III) zum entsprechenden Nitrosoderivat oxydiert worden, das im Ätherextrakt ein UV-Spektrum mit λ_{max} 285 nm und 306 nm ergab. Dieses Nitrosoderivat bzw. sein Spektrum (wenn auch nicht so sauber) erhielt man auch, wenn man 200 µg N-(4-Sulfamoylphenyl)-hydroxylamin in 10 ml Urin mit $K_3[Fe(CN)_6]$ oxydierte und mit Äther extrahierte.

Auch die Aufbereitung des nicht inkubierten Harns brachte ein negatives Ergebnis.

C.5. Metabolite des Sulfanilamids im Harn des Menschen

C.5.1 Nach Inkubation mit Glucuronidase durch Äthylacetat extrahierbare Metabolite

Einer männlichen Versuchsperson (27 Jahre alt, 75 kg Gewicht) wurden 1500 mg nichtmarkiertes und 9.0 mg ^{35}S-markiertes Sulfanilamid (Radioaktivität 5.9465×10^8 dpm) in Oblatenkapseln verabreicht. Der Harn wurde 9 Tage gesammelt, die Probe des 9. Tages enthielt weniger als 0,05% der verabreichten Radioaktivität. Insgesamt wurden 86,3% der verabreichten Radioaktivität in diesem Zeitraum im Urin erfasst.

Die Faeces wurden 6 Tage lang gesammelt. Eine Messung der Radioaktivität des Stuhles vom 2. Tag nach der Sulfanilamidverabreichung ergab jedoch bei der Scintillationszählung einen Wert von weniger als 0,2% der verabreichten Dosis, so dass auf seine Aufarbeitung verzichtet wurde.

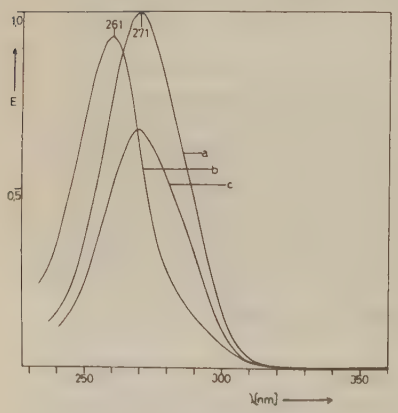
Die Ausscheidung des Sulfanilamids und seiner Metabolite im Urin des Menschen verlief wesentlich langsamer als im Versuch mit Kaninchen. Wie Tabelle 6 zeigt, wurden am ersten Tag nur 55,4% der verabreichten Dosis mit dem Urin eliminiert gegenüber 83,7% bei den Kaninchen. Der Wert von 83,7% wurde im Humanversuch erst annähernd nach drei Tagen erreicht.

Die Chromatographie des bei pH 6,0 erhaltenen Extrakts ergab fünf radioaktive Zonen, die nach ihren R_F-Werten N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV), Sulfanilamid (XXVIII), N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX), N-(4-Acetylaminobenzol-

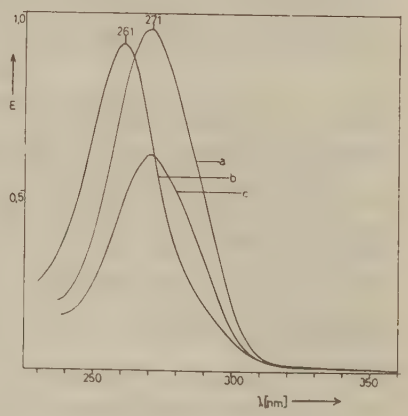
sulfonyl)-acetamid (XXXV) und N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid (XXXI) sein sollten.

Die Identifizierung von Sulfanilamid, N_4-Acetamid und N_4-Glykolamid bereitete ebenso wie im Versuch mit Kaninchen keine Schwierigkeiten.

N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid wurde durch Trennung über Sephadex LH-20, wie in der Darstellung des Stoffwechsels von Sulfanilamid bei Kaninchen für das N_1,N_4-Diacetamid beschrieben, soweit gereinigt, dass sein UV-Spektrum in Methanol, neutral und nach Zugabe von NaOH, identisch war mit der synthetischen Substanz. Da die geringen Mengen eine Kristallisation und IR-Messung nicht erlaubte, bleibt der Identitätsnachweis auf die Übereinstimmung der nachfolgend abgebildeten Spektren beschränkt (Abb. 2).



2.1



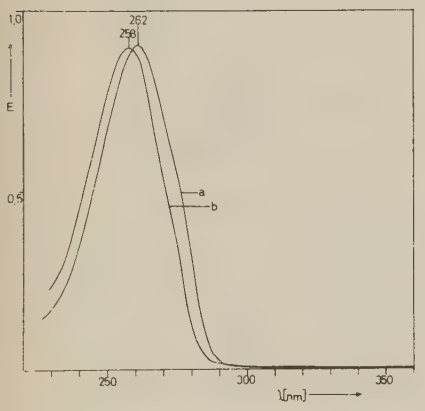
2.2

Abb. 2

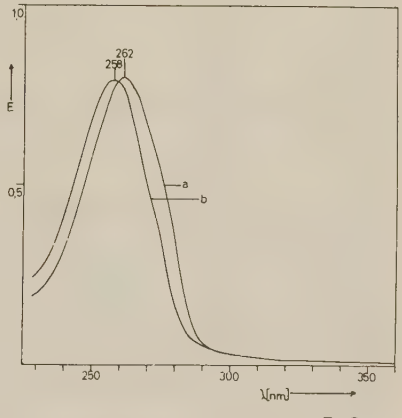
UV-Spektren von N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid in Methanol; 2.1 synthet. (1,12 mg/100 ml), 2.2 als Metabolit.

a. Neutral in Methanol,
b. nach Zugabe von 0,07 ml 2n NaOH zu 3 ml methanol. Lösung,
c. nach Zugabe von 0,14 ml 2n HCl zu b.

Zur Identifizierung von N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid war ebenfalls, wie auch schon bei demselben Metaboliten im Kaninchenversuch eine Reinigung über Sephadex LH-20 erforderlich. Da auch hierbei die Ausbeute zu gering war für Kristallisation und IR-Messung, muss hier ebenfalls der Identitätsnachweis von Metabolit und synthet. Substanz auf das UV-Spektrum beschränkt bleiben (Abb. 3).



3.1



3.2

Abb. 3

UV-Spektren von N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid in Methanol; 3.1 synthet. (0,95 mg/100 ml), 3.2 als Metabolit.
a. Neutral in Methanol,
b. nach Zugabe von 0,07 ml 2n NaOH zu 3 ml methan. Lösung.

Tabelle 6

Sulfanilamid (XXVIII) und seine Metabolite, isoliert aus dem Harn einer männlichen Versuchsperson von 75 kg Körpergewicht nach Gabe von 1500 mg nichtmarkiertem und 9 mg ^{35}S-markiertem Sulfanilamid, Inkubation des Harns mit Glucuronidase und Extraktion mit Äthylacetat.

Zeit in Std.	N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV)		Sulfanilamid (XXVIII)		N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX)		N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXV)		N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid (XXXI)		Summe der Metabol.	Radioaktivität % der Dosis	
	mg	% der Dosis *)	mg	% der Dosis *)	mg	% der Dosis	mg	% der Dosis *)	mg	% der Dosis *)	% der Dosis	gesamt	nicht extrahiert
0-24	5,9	1,0	350,4	27,6	457,3	24,3	6,5	0,6	19,3	1,0	54,5	55,4	3,0
24-48	-		61,4	4,8	288,5	15,4	-		8,3	0,4	20,6	21,4	0,4
48-72	-		9,7	0,8	78,0	4,2	-		15,0	0,8	5,8	6,2	0,3
	5,9	1,0	421,5	33,2	823,8	43,9	6,5	0,6	42,6	2,2	80,9	83,0	3,7

*) korrigiert nach den Ergebnissen der Verlustbestimmung (Tabelle 3).

Tabelle 6 zeigt, dass 33% des verabreichten Sulfanilamids innerhalb von drei Tagen unverändert ausgeschieden wurden, 44% der Dosis wurden in diesem Zeitraum als N_4-Acetat und 4% als N_1-Acetat, N_1,N_4-Diacetat und N_4-Glykolamid ausgeschieden.

Die Aufarbeitung des bei pH 1,7 erhaltenen Extrakts zeigte nur Spuren von Sulfanilamid. Oxa säure konnte nicht nachgewiesen werden.

C.5.2. Analyse der mit Äthylacetat nicht extrahierbaren Radioaktivität

Bei der Untersuchung des Stoffwechsels von Sulfanilamid beim Menschen verblieb, wie auch beim Versuch mit Kaninchen, eine "Rest-Radioaktivität" im Urin (3,0% beim Menschen), die auch durch Extraktion mit n-Butanol bzw. durch Extraktion nach weiteren Inkubationen nicht zu verringern war.

Dieser nach Inkubation mit Glucuronidase mit Äthylacetat extrahierte Urin wurde eingedampft, der Rückstand mit 50 ml Methanol aufgenommen und zentrifugiert. Durch Scintillationsmessung wurde festgestellt, dass sich die gesamte Radioaktivität im methanolischen Überstand befand. Die DC-Trennung eines Teils dieser methanolischen Lösung ergab, wie im Versuch mit Kaninchen, drei radioaktive Zonen.

Eine dieser Zonen war wiederum auf Grund von R_F-Wert und UV-Spektrum Sulfanilamid, die beiden anderen liessen sich durch erneute Dünnschichtchromatographie nicht reinigen, daher wurde die restliche methanolische Lösung in zwei Portionen über Sephadex LH-20 getrennt (20 g, in MeOH gequollen, Säule von 1,1 cm Durchmesser, 60 cm Höhe). Eluiert wurde mit Methanol. Es wurden drei radioaktive Fraktionen erhalten.

a) Die zuerst eluierte radioaktive Fraktion war nach Verdunsten des Methanols in einem schleimigen Rückstand enthalten, der mittels DC nicht zu trennen war. Bei anschliessender Passage über Sephadex G-10 (die Fraktionen waren zur Trockne gebracht und danach in Wasser aufgenommen worden) liess sich aber eine kleine Probe von der schleimigen Phase abtrennen. Diese Probe wurde chromatographisch gereinigt (Laufmittel wie bei Äthylacetatextrakten), und die radioaktive Zone mit Methanol eluiert.

Die Absorptions-Messung in Methanol ergab ein eingipfliges Maximum bei 261 nm mit angedeuteter Schulter bei 275 nm. Zugabe von 0,07 ml 2n NaOH zu 3 ml methanolischer Lösung führte zu einem uncharakteristischen Spektrum mit λ_{max} bei 242 nm. Nach Zugabe von 0,14 ml 2n HCl zu dieser Lösung zeigte sich wieder das ursprüngliche Spektrum. Vermutlich ist die durch Alkali-Zusatz eingetretene Verschiebung auf Verunreinigung zurückzuführen, die sich aber wegen der geringen Menge nicht abtrennen liess.

b) Die zweite radioaktive Fraktion ergab bei der DC eine radioaktive Zone mit dem R_F von Sulfanilamid (XXVIII). Auch ihr UV-Spektrum in Methanol p.a. war identisch mit dem von Sulfanilamid.

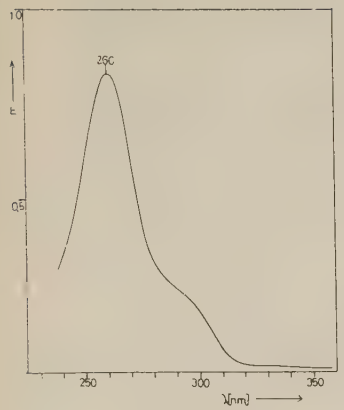
c) Der dritte Bereich radioaktiver Fraktionen ergab nach DC eine radioaktive Zone, deren Eluat im UV-Spektrum (siehe Abbildung 4.1) ein Maximum bei 260 nm und eine Schulter bei 295 nm zeigte.

Da dieses Spektrum Ähnlichkeit mit dem von R.T. Williams für 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI)[53] angegebenen (λ_{max} 292 u. 259 nm in H_2O) hatte, wurde zunächst vermutet, dass der Metabolit diese Substanz in noch unreiner Form sei. Nochmalige Trennung über Sephadex LH-20 sowie DC-Elektrophorese erbrachten aber keine Veränderung der Substanz bzw. deren UV-Spektrum. Diese Tatsache sowie die hohe Polarität der Substanz deuteten auf das Vorliegen eines Konjugats, das durch die vorangegangenen Inkubationen im Urin nicht gespalten worden war.

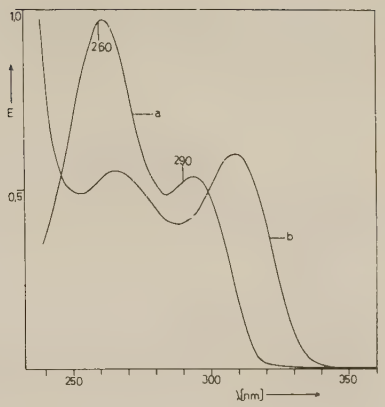
Daher wurde die Probe nach Verdunsten des Methanols in 15 ml Wasser aufgenommen und bei pH 5,2 sechs Stunden mit dem Inhalt von 1 Ampulle Suc d'Helix pomatia inkubiert. Bei pH 7 wurde anschliessend mit Äthylacetat extrahiert und die freigesetzte Radioaktivität über DC gereinigt. Es wurde eine radioaktive Zone erhalten, deren R_F-Wert und deren Eluat im UV-Spektrum identisch waren mit dem von 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (siehe Abbildung 4).

Auch hierbei wurde, wie bei dem gleichen Metaboliten des Versuchs mit Kaninchen, der Identitätsnachweis durch den Vergleich der R_F-Werte und der UV-Spektren geführt. Die UV-Spektren sind in Abbildung 4 wiedergegeben.

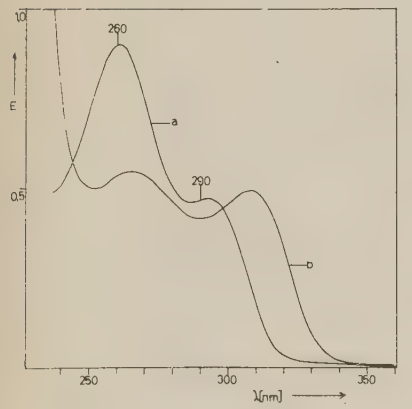
Quantitativ wurden 6,75 mg 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid bestimmt, was 0,5% entspricht. Auch bei diesem Wert muss die Einschränkung gemacht werden, dass bei der Isolierung eventuell ein grösserer Teil verloren geht, als durch die Bestimmung des Verlusts von nichtkonjugiertem 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid bei Inkubation und Isolierung erfasst wird.



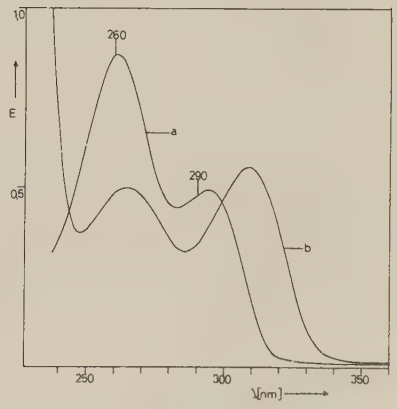
4.1



4.2



4.3



4.4

Abb. 4

UV-Spektrum von 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid in Methanol; 4.1 als Konjugat, 4.2 synthet. (1,61 mg/100 ml), 4.3 als Metabolit des Versuchs mit einem Menschen, 4.4 als Metabolit des Versuchs mit Kaninchen.

a. Neutral in Methanol,
b. nach Zugabe von 0,07 ml 2n NaOH zu 3 ml methanol. Lösung.

Tabelle 7

N-Hydroxy-Derivate und Hydroxylierungsprodukte des Acetylrestes von N-Arylacetamiden, bestimmt im Harn, der von Kaninchen während 24 Stunden nach Verabreichung von 50 mg verschiedener N-Arylacetamide je kg Körpergewicht ausgeschieden wurde.

Substanz	Zahl der Kaninchen	Glykolamid [Oxaminsäure] % d. Dosis**)	N-Hydroxyacetamid % d. Dosis**)
N-(2-Fluorenyl)-acetamid (I) +)	5 4	0,1 0,1	18,5 23,3
N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV)	5	0,5	6,9
N-(2-Phenanthryl)-acetamid (VII) +)	5	0,02	5,9
N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid (X)	4	(0,2)	1,5
N-(2-Naphthyl)-acetamid (XIII)	5 3	<0,05***) <0,05***)	<0,1***) <0,2***)
N-(3-Biphenylyl)-acetamid (XVI) +)	4	0,2	-
N-(4-Propionylphenyl)-acetamid (XIX) +)	12 10	5,2 0,2; [14,5]	<0,8***) <1,6***)
N-(4-Chlorphenyl)-acetamid (XXII) +)	3 6	2,3 [3,4] 11,8 [5,9]	<0,5***) <0,5***)
N-(4-Bromphenyl)-acetamid (XXV) +)	5	5,7	-
N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid	4	5,4 [5,0]	<0,3***)

Die mit +) versehenen Substanzen wurden von W. Lenk untersucht[17].

**)Werte korrigiert nach den Ergebnissen der Bestimmung der Verluste, die bei der Inkubation und Extraktion dieser Substanzen auftreten (Tabelle 3).

***)Höchstmengen, die dem Nachweis entgangen sein könnten, berechnet nach den Ergebnissen der Rückgewinnung dieser Substanzen (Tab.3).

D. DISKUSSION

Wir haben bei einer Reihe von N-Arylacetamiden untersucht, ob ihr Acetamidbereich im Stoffwechsel von Kaninchen bevorzugt am Stickstoff oder am Acetylrest hydroxyliert wird.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Sie zeigen, daß die Hydroxylierung in diesem Bereich in sehr unterschiedlichem Ausmaße durchgeführt wird. Sie erreichte sehr hohe Werte bei N-(2-Fluorenyl)-acetamid (18,5 bzw. 23,3%) und N-(4-Chlorphenyl)-acetamid (5,7 bzw. 17,7%), war überhaupt nicht, oder nur in geringer Menge nachweisbar bei N-(2-Naphthyl)-acetamid bzw. N-(3-Biphenylyl)-acetamid und lag bei den anderen Substanzen zwischen diesen Extremen.

Aus den drei Substanzen, die in hohem Maße am Stickstoff hydroxyliert wurden, N-(2-Fluorenyl)-acetamid (I), N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV) und N-(2-Phenanthryl)-acetamid (VII) - sie sind als Cancerogene bekannt - wurden Glykolamide zwar nur in einer Konzentration bis zu 0,5% gebildet, damit ist aber gezeigt, daß die Essigsäure-Hydroxylierung im Organismus auch bei solchen Verbindungen prinzipiell möglich ist.

Cramer, Miller and Miller[11], die als erste N-Hydroxy-N-(2-Fluorenyl)-acetamid (III) als Stoffwechselprodukt des Acetamides in vivo fanden, bestimmten seine Konzentration zu 1o-14% im Harn von Ratten nach Beigabe von N-(2-Fluorenyl)-acetamid zum Futter während eines Zeitraums von mindestens 6 Wochen.

Irving[25] fand 2o Prozent und mehr der Dosis des Acetamids als N-Hydroxylierungsprodukt im Harn von Kaninchen nach Gabe von 7o mg/kg.

Diese quantitativen Angaben stimmen gut überein mit unseren Befunden (18,5 bzw. 23,3% nach Gabe von 50 mg/kg).

Neben der Hydroxylierung am Stickstoff, die auch beim Menschen[10] sowie bei einer Reihe anderer Tiere gefunden wurde, spielt die metabolische Hydroxylierung zu Phenolen beim N-(2-Fluorenyl)-acetamid eine grosse Rolle. Die Ratte hydroxyliert in 1-,3-,5-,6-,7- und 8-Position[50], die Maus in 1-,3-,5-,7-Stellung[43], der Mensch am C-7[51]. Die Hydroxylierung in 7-Position ist bei allen untersuchten Spezies bevorzugt[2].

Der Stoffwechsel von N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV) war bereits bei Ratte und Hund untersucht worden[44]. Ein Jahr alte Ratten hatten 0,5% einer Dosis von 4 mg/100 g Körpergewicht als N-Hydroxylierungsprodukt ausgeschieden, Hunde nach Gabe von 20 mg/kg 7 - 20%.

Im Urin von Kaninchen wurden in unseren Versuchen nahezu 7 % als Hydroxamsäure bestimmt.

E.C.Miller et al.[41] fanden nach Gabe von 8,5 mg/100 g Körpergewicht N-(2-Phenanthryl)-acetamid (VII) im Urin von jungen Ratten bis zu 0,5% N-Hydroxy-N-(2-phenanthryl)-acetamid.

Demgegenüber liegt unser Wert von 5,9% der Dosis bei Versuchen mit Kaninchen wesentlich höher.

Unter den Stoffwechselprodukten von N-(2-Naphthyl)-acetamid (XIII) konnten wir die entsprechende Hydroxamsäure nicht nachweisen.

Im Urin von Affen hatten Enomoto et al.[14] nach Gabe dieses Acetamids nur Spuren eines Metaboliten mit den Eigenschaften des N-Hydroxy-N-acetylderivates gefunden. Poirier et al.[45] bestimmten annähernd 0,1% einer Dosis von 500 mg Acetamid als Hydroxamsäure unter den Stoffwechselprodukten des N-(2-Naphthyl)-acetamids beim Hund, nach Gabe von 131 mg war aber auch diese geringe Konzentration nicht mehr nachzuweisen. Boyland and

Manson [6] gaben einem Hund an drei aufeinanderfolgenden Tagen 4oo mg des Acetamids und konnten im Urin die entsprechende Hydroxamsäure identifizieren, nicht jedoch nach Gabe von 5oo mg an Ratte, Meerschweinchen und Hamster.

N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid (X) wurde zu einem Anteil von 1,5% der Dosis zur Hydroxamsäure metabolisiert, besitzt also offenbar noch die Eigenschaften, die eine Hydroxylierung am Stickstoff ermöglichen.

Glykolamid war nicht eindeutig identifizierbar, seine Konzentration betrug nicht mehr als o,2% der Dosis.

Neben dem Glykolamid wurden noch andere neutrale, polare Metabolite des N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamids beobachtet, vermutlich am Cyclohexanring hydroxylierte Verbindungen, die aber nicht näher untersucht wurden.

Im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Substanzen konnten wir nach i.p. Injektion von je 5o mg/kg Körpergewicht N-(4-Sulfamoylphenyl)-, N-(4-Bromphenyl)-, N-(4-Chlorphenyl)-, N-(3-Biphenylyl)- und N-(4-Propionylphenyl)-acetamid als Stoffwechselprodukte im Urin von Kaninchen keine Hydroxamsäure nachweisen, obwohl nach den Ergebnissen der Bestimmung der Verluste, die bei der Inkubation und Extraktion der Hydroxamsäure auftreten (Tab. 3), auch kleine Mengen noch eindeutig nachweisbar sind.

Der Organismus metabolisiert die Acetamidregion dieser Verbindungen durch Hydroxylierung des Acetylrestes, es wird Glykolamid gebildet, welches beim Versuch mit N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX) und N-(4-Chlorphenyl)-acetamid (XXII) teilweise zu Oxaminsäure oxydiert wird.

Dass die Bildung der Oxydationprodukte des Acetylrestes nach diesem Schema verläuft und nicht durch unmittelbare Verknüpfung eines deacetylierten Amins mit Glykolsäure , muß in Analogie zu Arbeiten von Jagow et al.[27] und Kiese und Lenk[32,33,34,] geschlossen werden.

Die Ergebnisse der Versuche mit N-(4-Propionylphenyl)-acetamid (XIX) und N-(4-Chlorphenyl)-acetamid zeigen, daß auch bei Versuchen mit der gleichen Substanz bei derselben Tierart erhebliche Schwankungen in der Ausscheidungsmenge eines Metaboliten auftreten (5-15% bzw. 6-15%). Auch wurde überraschenderweise N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid von Kaninchen in geringerem Maße als Sulfanilamid zu Glykolamid bzw. Oxaminsäure metabolisiert, obwohl Sulfanilamid zuerst acetyliert werden muß, was bedeutet, daß gerade diese Tatsache die Hydroxylierung am Acetylrest begünstigt.

Ungeachtet dessen spielt, mit Ausnahme von N-(3-Biphenylyl)-acetamid, bei diesen N-Arylacetamiden die Hydroxylierung am Acetylrest eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel.

Der Vergleich zwischen den Strukturen der untersuchten Substanzen und der Hydroxylierung am Stickstoff bzw. am Acetylrest zeigt, daß offenbar in 4-Position zur Acetamidgruppe am Benzolkern ein Substituent von der Grösse eines Phenylrestes vorhanden sein muss, um die Hydroxylierung am Stickstoff zu ermöglichen.

N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV), N-(2-Phenanthryl)-acetamid (VII) und N-(2-Fluorenyl)-acetamid (I) erfüllen diese Bedingungen. Im Biphenyl, Fluoren und Phenanthren sind die aromatischen Ringe ausserdem koplanar angeordnet.

N-(3-Biphenylyl)-acetamid (XVI) und N-(2-Naphthyl)-acetamid (XIII), bei deren Stoffwechseluntersuchungen keine Hydroxamsäuren als Metabolite nachgewiesen werden konnten, besitzen in p-Position zur Acetamidgruppe keinen Substituenten.

Die Substitution des Benzolkerns in p-Position zur Acetamidgruppe durch einen Cyclohexyl- statt einem Phenylrest bedingt eine Verringerung des Anteils an Hydroxamsäure unter den Stoffwechselprodukten. Dies kann zwei Gründe haben:

der Cyclohexylrest erfüllt möglicherweise gerade noch die sterischen Bedingungen für die Hydroxylierung am Stickstoff, hat aber als hydrierter Kohlenwasserstoff einen anderen Substituenteneffekt auf die Elektronenverteilung des Acetanilidrestes als eine Phenylgruppe, oder aber dieser zuletzt genannte Effekt spielt keine Rolle und die verminderte Hydroxamsäurebildung ist bedingt durch die sterische Verschiedenheit von Biphenyl und Phenylcyclohexan. Daß ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der mischfunktionellen Oxygenierung und der Elektronenverteilung bzw. der Elektronendichte am Reaktionsort der jeweiligen Substanz besteht, ist auf Grund von theoretischen Arbeiten von Daudell und Pullmann[13], Arrhenius[3] und anderen anzunehmen.

Im Gegensatz zu den soeben besprochenen Kohlenwasserstoffsubstituenten, die eindeutig eine Hydroxylierung am Stickstoff gegenüber der Glykolamidbildung begünstigen, dirigiert, wie unsere Ergebnisse zeigen, ein Chlor-, Brom-, Propionyl- oder Sulfamoylrest als Substituent in 4-Position eines Acetanilids die Hydroxylierung in vivo zur Acetylkomponente des Acetamidbereichs. Die eindeutige Begünstigung dieses Stoffwechselweges bei obigen Substanzen ist wohl durch die Ausschaltung von Konkurrenzreaktionen, besonders der Hydroxylierung in p-Position bedingt. Unsubstituiertes Acetanilid wird in vivo[9] und in vitro[35,46] überwiegend in 4-Position hydroxyliert. Als Daly et al.[12] die Hydroxylierung verschiedener halogen- und alkylsubstituierter Aniline und Acetanilide mit Lebermikrosomen studierten, fanden sie, daß 4-Chloracetanilid nur in Spuren zu 4-Hydroxyacetanilid metabolisiert wird, 3-Chlor-4-hydroxyacetanilid, das gemäß dem "NIH-shift" gebildet worden sein könnte, war nicht nachweisbar. 4-Fluoracetanilid wurde zu etwas grösserem Maße zur 4-Hydroxyverbindung metabolisiert und 4-Methyl- und 4-Äthylacetanilid wurden an ihren Alkylseitenketten hydroxyliert. Daly und Mitarbeiter zogen daraus den Schluß, daß die Ring-Hydroxylierung von Substanzen blockiert wird, wenn diese ein Halogen an der Stelle der bevorzugten Aryl-Hydroxylierung besitzen.

Offenbar ist, wie unsere Ergebnisse zeigen, bei N-Arylacetamiden durch eine Substitution mit Halogen und anderen, durch Enzyme schwer angreifbaren Gruppen, wie dem Sulfamoyl- und dem Propionylrest, die Hydroxylierung des Acetylrests besonders begünstigt.

Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß die Affinität eines "substrate guide" (er entscheidet, welche Stelle einer Molekel hydroxyliert wird) durch Substituenten in seiner Affinität zu dem Stoff verändert wird, und damit die Hydroxylierung dieses Stoffes in eine andere Richtung gelenkt wird[21,32].

Tabelle 8

Vergleich der Stoffwechselbilanzen von Sulfanilamid beim Menschen (nach Gabe von 1509 mg per os) und beim Kaninchen (nach Gabe von 50 mg/kg intraperitoneal).

Metabolit isoliert	beim Versuch mit einem Menschen *) % der Dosis	beim Versuch mit Kaninchen *) % der Dosis
N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV)	1,0	-
Sulfanilamid (XXVIII)	33,2	4,6
N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX)	45,4	46,9
N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXV)	0,6	1,4
N-(4-Sulfamoylphenyl)-glykolamid (XXXI)	2,2	20,1
4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI)	0,5	1,1
N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure (XXXII)	-	14,5
Summe der Metabolite	82,9	88,6
Radioaktivität des Harns, indem die Metabolite bestimmt wurden (% d.Dosis)	85,0	87,7

Die Werte des Versuchs mit Kaninchen wurden im Urin, der während 48 Stunden nach Injektion ausgeschieden wurde, bestimmt (imHarn des dritten Tages waren nur noch 0,2% der verabreichten Radioaktivität nachweisbar),die Daten des Versuchs mit einem Menschen wurden im Harn der ersten vier Tage nach Gabe des Sulfanilamids ermittelt (der Harn des fünften Tages enthielt nur noch 0,8% der Gesamtdosis an Radioaktivität).

*) Werte sind korrigiert nach den Ergebnissen der Bestimmung der Verluste, die bei der Inkubation und Extraktion dieser Substanzen auftreten (Tab.3).

Wie Tabelle 8 zeigt, spielt die Hydroxylierung des N-Acetylrestes auch bei Sulfanilamid eine grosse Rolle. Im Urin von Kaninchen wurden nahezu 35% des verabreichten Sulfanilamids als Glykolamid bzw. Oxaminsäure ausgeschieden, womit dieser Metabolisierungsweg annähernd die Bedeutung der Acetylierung erhält.

Während beim Kaninchen nur am N_4 acetyliertes Sulfanilamid entdeckt werden konnte, wurde im Urin des Menschen auch das am N_1 acetylierte Sulfanilamid in einer Konzentration von 1% der verabreichten Dosis nachgewiesen. Dies bestätigt den Befund von Boyer et al.[5], die N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV) papierchromatographisch im Harn des Menschen festgestellt hatten. Das von ihnen auf die gleiche Weise im Urin von Kaninchen nachgewiesene N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXV) wurde in unserem Versuch in einer Konzentration von weniger als 1% der Dosis auch im Urin des Menschen festgestellt.

Ebenfalls in dieser Menge wurde 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid als Metabolit im Versuch mit einem Menschen festgestellt (Williams and Ansell[55] hatten es bereits mittels des Absorptionsspektrums seines Eisenkomplexes im Urin von Patienten nach Gabe von Sulfanilamid bestimmt). Auch im Urin von Kaninchen wurde dieser Metabolit gefunden und zwar zu 1,o% der Gesamtdosis (Williams[52] hatte ihn als Stoffwechselprodukt des Sulfanilamids bei Kaninchen isoliert).

Eine wesentlich geringere Bedeutung als beim Kaninchen hat die Metabolisierung des Sulfanilamids zu Glykolamid beim Menschen. Nur 2,2% der applizierten Dosis an Sulfanilamid wurden im Urin gefunden, Oxaminsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß die geringe Konzentration an Glykolamid die Bildung von nachweisbaren Mengen Oxaminsäure unmöglich macht, oder daß das Enzymsystem des menschlichen Organismus nicht in der Lage ist, Glykolamid zu Oxaminsäure zu oxydieren, wie dies schon beim Schwein beobachtet wurde, das 11% einer Dosis von N-(4-Chlorphenyl)-acetamid als entsprechendes Glykolamid ausschied, jedoch keine Oxaminsäure[34].

Keine sichere Aussage kann zur Frage der Ausscheidung von N-Hydroxylierungsprodukten des Sulfanilamids gemacht werden. Sowohl beim Stoffwechselversuch mit einem Menschen wie auch bei dem mit Kaninchen blieb je ein Metabolit unidentifiziert.

Der Harn des Versuchs mit einem Menschen, der nach Inkubation mit Glucuronidase und Extraktion bei pH 6,o und 1,7 verblieb und noch eine "Rest-Radioaktivität" aufwies, ergab nach Trennung über Sephadex eine radioaktive Fraktion, die ein Absorptionsmaximum in Methanol von 261 nm hatte wie N_4-Hydroxysulfanilamid (XXIX). Auf Grund dieses Spektrums und ihres R_F-Werts war sie jedoch mit keinem der bekannten Metabolite des Sulfanilamids identisch. Nach Zugabe von o,o7 ml 2n NaOH zu 3 ml methanol.Lösung des Metaboliten lag das Absorptionsmaximum bei 242 nm, nach Zugabe von o,14 ml 2n HCl zu der alkalischen Lösung hatte das UV-Spektrum wieder denselben Verlauf wie vor der Zugabe von NaOH. Das UV-Spektrum des synthet. N-Hydroxysulfanilamids wurde durch NaOH-Zugabe zur methanol. Lösung irreversibel verändert. Auf Grund dieser Tatsachen könnte man annehmen, daß der Metabolit ein Konjugat von N-Hydroxysulfanilamid ist. Seine Konzentration kann nach Messung der Radioaktivität höchstens 1% der Gesamtdosis betragen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

N-Arylacetamide werden im tierischen Organismus zu einem wesentlichen Teil durch Hydroxylierung metabolisiert. Einige carcinogene N-Arylacetamide werden am Stickstoff hydroxyliert, wodurch die carcinogene Wirkung erst ermöglicht wird.

Andererseits werden N-Arylacetamide auch am Acetylrest hydroxyliert, wobei Glykolamide bzw. Oxaminsäuren entstehen.

Es wurden untersucht, welche Faktoren bei einem Acetanilid dafür verantwortlich sind, dass es entweder am Stickstoff oder am Acetylrest hydroxyliert wird.

N-(2-Fluorenyl)-$^{+)}$, N-(4-Biphenylyl)-, N-(2-Phenanthryl)-$^{+)}$, N-(4-Cyclohexylphenyl)-, N-(2-Naphthyl)-, N-(3-Biphenylyl)-$^{+)}$, N-(4-Propionylphenyl)-$^{+)}$, N-(4-Chlorphenyl)-$^{+)}$, N-(4-Bromphenyl) und N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid wurden Kaninchen in einer Dosis von 50 mg/kg intraperitoneal oder per os verabreicht (die mit + versehenen Substanzen wurden von Dr. W.Lenk untersucht). Die Metabolite wurden aus dem Urin extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt, isoliert und durch UV- und IR-Spektren identifiziert.

Die Untersuchung des Stoffwechsels von N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid ergab einen hohen Anteil an Hydroxylierungsprodukten des Acetylrestes. Darum wurde auch Sulfanilamid, dessen Hauptmetabolit N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid bei Mensch und Tier ist, in die Untersuchung einbezogen mit der Fragestellung, ob die Glykolamid- bzw. Oxaminsäurebildung auch hier eine wesentliche Rolle spielt, ferner ob N-Hydroxylierungsprodukte des Sulfanilamids (Ferrihämoglobinbildner) im Urin nachweis-

bar sind, sowie in welcher Menge diese und die schon bekannten Metabolite gebildet werden. Der Versuch wurde bei Mensch und Tier mit ^{35}S-markiertem Sulfanilamid durchgeführt.

Die N-Arylacetamide wurden in sehr verschiedenem Ausmass im Acetamidbereich hydroxyliert: N-(2-Fluorenyl)-acetamid wurde zu etwa 20% der Dosis als Hydroxamsäure ausgeschieden, N-(4-Biphenylyl)- und N-(2-Phenanthryl)-acetamid zu etwa 6% und N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid nur zu 1,5%. Glykolamide traten als Metabolite dieser Substanzen nur zu höchstens 0,5% auf. Als Stoffwechselprodukt von N-(2-Naphthyl)-acetamid konnte weder die Hydroxamsäure noch das Glykolamid nachgewiesen werden.

N-(4-Propionylphenyl)-, N-(4-Chlorphenyl)-, N-(4-Bromphenyl)- sowie N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid wurden in erheblichem Ausmass am Acetylrest hydroxyliert; eine Hydroxamsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schliessen, dass das Vorhandensein eines Substituenten von der Grösse eines Phenylrestes in 4-Position des Acetanilids die Hydroxylierung des N-Arylacetamids am Stickstoff begünstigt. Ist die 4-Position dagegen mit einem kleinen Substituenten besetzt, der biochemisch schwer angreifbar ist, wie Halogen, die Sulfamoyl- oder Propionylgruppe, so wird der Acetylrest hydroxyliert.

Die Untersuchung des Stoffwechsels von Sulfanilamid ergab, dass beim Kaninchen in grossem Ausmass das primär gebildete N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX) am Acetylrest hydroxyliert wird: 20% des verabreichten Sulfanilamids wurden im Harn als Glykol-

amid gefunden und weitere 14% als Oxaminsäure. Im Harn des Menschen konnten dagegen nur 2% der Dosis des Sulfanilamids als Glykolamid identifiziert werden.

Als weitere Metabolite wurden bestimmt: N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX) (bei Mensch und Kaninchen über 45% der Dosis Sulfanilamid), N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV) (1% beim Menschen), das an N_1 und N_4 acetylierte Sulfanilamid (XXXV) (beim Menschen 0,6%, beim Kaninchen 1,4%) und das 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI) (0,5% beim Menschen und 1% beim Kaninchen.

Unverändert wurde Sulfanilamid vom Menschen zu 33%, vom Kaninchen nur zu 4,6% der Dosis ausgeschieden.

F. EXPERIMENTELLER TEIL

F.1. Materialien

F.1.1. Substanzen und Geräte zur Analyse der Metabolite

Konjugate der Metabolite wurden gespalten mit Sigma ß-Glucuronidase (Sigma Chemical Company, St. Louis), ß-Glucuronidase-Aryl-Sulfatase Boehringer (Boehringer Mannheim) und ß-Glucuronidase Sulfatase "Suc d'Helix pomatia" (Industrie Biologique Francaise).

Als Sorptionsmittel für die Dünnschichtchromatographie diente Kieselgel PF_{254} (Merck, Darmstadt), zur Gelfiltration fanden Sephadex LH-20 und G-10 (Deutsche Pharmacia, Frankfurt/M.) Verwendung.

Die Radioaktivität auf Dünnschichtplatten wurde mit Dünnschicht-Scanner II (Lab. Prof.Dr. Berthold, 7574 Wildbad) gemessen. Die UV-Spektren wurden geschrieben mit Beckman DK-2A (Beckman, Fullerton, Calif.) und Cary 14 (Applied Physics Corp. Monrovia, Calif.).

Die NMR- und IR-Spektren wurden im Max-Planck-Institut für Biochemie, München, aufgenommen; die NMR-Spektren mit einem Varian 100 (Varian Analyt. Instr. Div., Palo Alto, Calif.), die IR-Spektren mit einem Perkin-Elmer 225 (Bodenseewerk Perkin-Elmer und Co. Überlingen).

Zur Dünnschichtelektrophorese wurde ein Elphor-Gerät (Dr.Bender und Dr. Hobein, München) benutzt.

F.1.2. Synthese bzw. Herkunft der untersuchten Substanzen

^{35}S-markiertes Sulfanilamid (XXVIII) mit der spezifischen Radioaktivität von 5,2 mc/Mol wurde von The Radiochemical Centre Amersham bezogen.

N-Arylacetamide

Die N-Arylacetamide wurden durch Acetylierung der käuflichen Arylamine mit Acetanhydrid hergestellt. 4-Aminobiphenyl, 4-Aminophenylcyclohexan und 2-Naphthylamin wurden in Äther unter Eiskühlung mit äquimolaren Mengen Essigsäureanhydrid versetzt. Sulfanilamid wurde in wenig Dimethylformamid gelöst acetyliert. Die N-Arylacetamide bildeten sich schnell in den Reaktionsgemischen und wurden aus Äthanol, N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid aus 50% Äthanol umkristallisiert. Einheitlichkeit und Reinheit der Produkte wurden dünnschichtchromatographisch geprüft. Schmelzpunkte und Absorptionen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

N-Arylglykolamide

Die N-Arylglykolamide wurden von W. Lenk[17] synthetisiert. Ihre Schmelzpunkte, UV- und IR-Absorptionen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

N-Hydroxy-N-arylacetamide

Die N-Hydroxy-N-arylacetamide wurden dargestellt durch katalytische Hydrierung der entsprechenden Nitroverbindungen in Äthylacetat und Acetanhydrid nach E.C.Miller et al.[42]. Als Katalysator wurde Aktivkohle mit 5% Palladium (Degussa Hanau) verwendet.

Schmelzpunkte sowie UV- und IR-Absorptionen sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

1) N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid (XII)

a) 4-Nitrophenylcyclohexan wurde unter leichter Modifizierung der Methode von Mayes und Turner[38] synthetisiert. Dem Gemisch aus 45,4 ml Salpetersäure (d = 1,52) und 19,2 ml Eisessig wurden 12 g Phenylcyclohexan in 22,8 ml Eisessig zugetropft. Während der Zugabe wurde die Temperatur der Reaktionsmischung mit Aceton-Trockeneis bei -5°C gehalten. Diese Temperatur erwies sich günstiger als die von Mayes und Turner angegebene (0° C), da sie die Ausbeute des 4-Nitroproduktes steigerte. Nach vollständiger Zugabe des Phenylcyclohexans wurde noch eine halbe Stunde gerührt, wobei die Temperatur auf 0° C anstieg und das zunächst dunkle Reaktionsgemisch sich aufhellte. Der Ansatz wurde sodann auf Eis gegeben, nach dem Schmelzen mit Benzol extrahiert und die Benzolphase nach mehrmaligem Waschen mit 1 n Natronlauge und Wasser über Calciumchlorid getrocknet. Bei der Destillation an der Ölpumpe ging die Hauptfraktion bei 174° bzw. 178-182° C (8 Torr) über. Nach Animpfen kristallisierte 4-Nitrophenylcyclohexan, während das

2-Nitroprodukt in Lösung blieb. Das nach Rekristallisation aus Äthanol einheitliche Produkt schmolz bei 54° C (Lit.: 57,5 - 58,5° C[38], 55° C[17]). λ_{max} in Methanol = 277,5 nm. Durch den Wert der UV-Absorption war das erhaltene Präparat vom 2,4-Dinitrophenylcyclohexan zu unterscheiden, welches den gleichen Schmelzpunkt hat[17].

b) N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid (XII)

2,05 g 4-Nitrophenylcyclohexan (0,01 Mol) wurden in einer Mischung von 50 ml Äthylacetat und 5 ml Acetanhydrid gelöst. Unter Stickstoffeinleitung wurden sodann 0,5 g Aktivkohle (5% Palladium) und anschliessend 0,25 ml Triäthylamin zugesetzt. Es wurde hydriert, bis 0,02 Mol Wasserstoff verbraucht waren, das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat am Rückfluss nach Zugabe von 100 ml Wasser und 100 ml konz. Ammoniak 20 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt.

Nach dem Erkalten wurde die wässrige Phase abgetrennt, der organische Überstand am Rotationsverdampfer bei 40° C zur Trockne gebracht und der Rückstand in 200 ml Äther gelöst. Der Äther wurde mit 100 ml und danach mit 50 ml 0,5 n NaOH extrahiert. Die alkalische Phase wurde 2 x mit 50 ml Äther geschüttelt und anschliessend mit konz. HCl auf pH 6 eingestellt. N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid fiel als weisser Niederschlag aus und wurde nach mehrmaligem Waschen mit H_2O aus Benzol umkristallisiert. Schmp. (korr.) 100° C.

$C_{14}H_{19}NO_2$ (233,3)	Ber.:	C 72,07	H 8,21	N 6,01	O 13,72
	Gef.:	71,91	8,00	6,18	13,91

2) N-Hydroxy-N-(4-biphenylyl)-acetamid (VI)

3,4 g 4-Nitrobiphenyl (0,015 Mol) wurden in einem Hydrierkolben in ca. 150 ml Äthylacetat gelöst und nach Zugabe von 10 ml Acetanhydrid hydriert und aufgearbeitet, wie bei der Synthese von N-Hydroxy-N-(4-cyclohexylphenyl)-acetamid beschrieben. Aus einem Benzol-Petroläthergemisch wurde umkristallisiert. Schmp. (korr.) 145 - 146° C (Lit.[44] : 144- 146° C).

3) N-Hydroxy-N-(2-naphthyl)-acetamid (XV)

2,86 g 2-Nitronaphthalin (0,02 Mol) wurden nach Lösen in 150 ml Äthylacetat und Zugabe von 10 ml Acetanhydrid hydriert, wie zuvor beschrieben. Das hydrierte Reaktionsgemisch wurde filtriert, mit 100 ml ca. 18% Ammoniak 15 min geschüttelt und schliesslich wieder von der ammoniakalischen Phase getrennt. Die organische Phase wurde 3 x mit 50 ml 0,05 n Natronlauge extrahiert, der alkalische Extrakt mit konz. HCl auf pH 6 eingestellt und wiederum mit Äther extrahiert. Der Äther-Extrakt hinterliess nach dem Verdampfen des Äthers einen öligen Rückstand. Dieser wurde mit ca. 3 ml Benzol aufgenommen und mit n-Hexan bis zur Trübung versetzt. Bei 4° C bildeten sich nach einigen Stunden Hydroxamsäurekristalle, die offenbar "Kristallbenzol" enthielten. Die groben Kristalle zerflossen bei Zimmertemperatur; nach Verdunsten des Benzols hinterblieben kleine gelbliche Kristalle, die sich aus $CHCl_3$-n-Hexan umkristallisieren liessen.

Schmp.: 65 - 66° C(korr.) (Lit.[6] : 76 - 78° C).

4) N-Hydroxy-N-(4-sulfamoylphenyl)-acetamid (XXXIII)

4,04 g 4-Nitrobenzolsulfonamid (0,02 Mol) wurden in Äthylacetat und Acetanhydrid, wie oben beschrieben, mit 600 ml Wasserstoff (weniger als 0,04 Mol) hydriert. Das Reaktionsgemisch wurde nach Filtration zunächst mit ca. 18%-igem Ammoniak einige Minuten geschüttelt und dann 3 x mit 50 ml 0,5 n Natronlauge. Die alkalischen Extrakte wurden mit konz. HCl auf p_H 5-6 eingestellt. Aus der angesäuerten ammoniakalischen Phase fiel in hoher Ausbeute die Hydroxamsäure aus.

Schmp. nach Rekristallisation aus Methanol: 226-27° C (korr.) (Lit.[8] : 227-29,5° C).

4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI)

wurde nach Thorpe und Williams[49] synthetisiert.

a) Benzoxazolon[20]

10 g Salicylamid wurden in 90 ml 10%-iger Natronlauge gelöst und nach Zugabe von 90 ml NaOCl-Lösung (hergestellt nach Graebe[19]) 20 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Nach vorsichtigem Neutralisieren mit etwa 15%-iger Salzsäure unter Eiskühlung fiel Benzoxazolon in grossen, gelben Flocken aus. Nach Umkristallisieren aus heissem Wasser fiel es in weissen Schuppen vom Schmp. (korr.) 137° C an. Ausbeute 3,5 g.

b) Benzoxazolon-6-sulfonsaures Natrium

Nach Friedländer[15] wurden 3,5 g Benzoxazolon in ca. 7 g Schwefelsäure (d = 1,84) unter Kühlung mit Eis mit 6 g rauchender Schwefelsäure versetzt. Dieses Sulfonierungsgemisch ist

konzentrierter als bei Friedländer angegeben, doch war nur so eine Umsetzung zu erzielen. Der Ansatz wurde nach Beendigung der Reaktion auf Eis gegossen. Nach dem Schmelzen wurde das Volumen auf 150 ml verdünnt und die Lösung durch vorsichtige Zugabe von Calciumhydroxid neutralisiert. Das ausgefallene Calciumsulfat wurde zentrifugiert, der Überstand mit 10%-iger Natronlauge schwach alkalisiert und auf etwa 30 ml eingeengt. Aus dieser Lösung wurde das Natrium-Benzoxazolonsulfat mit NaCl ausgesalzen. Es fiel als grobkristalliner Niederschlag aus, der scharf getrocknet wurde (2,0 g).

c) Benzoxazolon-6-sulfochlorid

Zur Chlorierung wurde das Natrium-Benzoxazolonsulfonat mit 2,4 g Phosphor(V)-chlorid versetzt und gelegentlich gerührt. Die Masse erwärmte sich schliesslich stark und bekam eine klebrige Konsistenz. Sie wurde nach 1/2 Stunde auf Eiswasser gegeben, wobei das Chlorid ausfiel. Es wurde mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 800 mg.

d) 4-Amino-3-hydroxybenzolsulfonamid (XXXVI)

Benzoxazolon-6-sulfochlorid wurde mit konzentriertem Ammoniak über Nacht zum Benzoxazolon-6-sulfonamid umgesetzt. Der gebildete Niederschlag wurde in warmer verdünnter Natronlauge gelöst. woraus beim Abkühlen das Na-Salz des Sulfonamids kristallisierte (300 mg).

Die Substanz wurde in 10 ml 30%-iger Natronlauge 20 Minuten am Rückfluss gekocht, die Lösung mit konz. HCl auf pH 7 eingestellt und fünfmal mit Äthylacetat extrahiert. Das 4-Amino-3-hydroxy-

benzolsulfonamid (XXXVI) verblieb nach Verdunsten des Lösungsmittels als gallertiger Rückstand, der sich aus absolutem Äthanol-Tetrachlorkohlenstoff kristallisieren liess (ca. 100 mg) Schmp. (korr.) 165° C (Lit.[24] : 164°). UV-Absorption in Wasser: λ_{max} = 291 und 258 nm. UV-Absorption in Methanol sowie NMR-Absorption s. Tabelle 12.

N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure (XXXII), N-(4-Aminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXIV) und N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid wurden von W. Lenk[16] synthetisiert. Ihre UV- und NMR-Absorptionen sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 9

Schmelzpunkte, Absorptionsmaxima und molare Absorptionskoeffizienten von N-Arylacetamiden

Substanz	Schmelzpunkt gefunden (korr.)	Lit.	UV-Absorption in Methanol λ_{max} (nm)	ε
N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV)	169-171° +)	167° 24)	272	27800
N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid (X)	128-129° ++)	128-129,5° 36)	246	17200
N-(2-Naphthyl)-acetamid (XIII)	130-131° +)	132° 37)	330	860
			315	880
			293	6200
			283	8600
			273	7600
			248	45400
			242	55000
N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX)	215-216° +)	219° 18)	258	23400

+) umkristallisiert aus Äthanol, ++) umkristallisiert aus 50%-igem Äthanol

Tabelle 10

Schmelzpunkte, UV-Absorptionsmaxima, molare Absorptionskoeffizienten und IR-Banden von N-Arylglykolamiden
Die Substanzen wurden synthetisiert von W. Lenk[16,17].

Substanz	Schmelzpunkt (korr.)	UV-Absorption in Methanol λ (nm)	ε	IR-Banden in KJ (cm^{-1})
N-(4-Biphenylyl)-glykolamid (V)	177-178,5°	λ_{max} = 271	28800	1658($\nu_{C=O}$) 1066(ν_{H_2C-OH})
N-(4-Cyclohexyl-phenyl)-glykol-amid (XI)	122,5-123,5°	λ_{max} = 244	16900	1652($\nu_{C=O}$) 1076(ν_{H_2C-OH})
N-(2-Naphthyl)-glykolamid (XIV)	136-138°	λ_{max} = 329 λ_{max} = 314 λ_{infl} = 292 λ_{max} = 283 λ_{max} = 274 λ_{infl} = 247 λ_{max} = 241	710 760 5700 8100 7200 41600 51600	1648($\nu_{C=O}$) 1082(ν_{H_2C-OH})
N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-glykol-amid (XXXI)	209-210°	λ_{max} = 257	22500	1698($\nu_{C=O}$) 1084(ν_{H_2C-OH})

Tabelle 11

Schmelzpunkte, UV-Absorptionsmaxima, molare Absorptionskoeffizienten und IR-Banden von N-Hydroxy-N-arylacetamiden

Substanz	Schmelzpunkt gefunden (korr)	Schmelzpunkt Lit.	UV-Absorption in Methanol λ (nm)	ε	λ(nm) -nach Zugabe von 0,07ml 2n NaOH zu 3ml Lösung	IR-Banden in KJ (cm^{-1})
N-Hydroxy-N-(4-biphenylyl)-acetamid (VI)	145-146° +)	144-146° 44)	λ_{max}=277	22800	λ_{max}=310 λ_{max}=246	3260(ν_{N-OH}) 1633($\nu_{C=O}$)
N-Hydroxy-N-(4-cyclohexyl-phenyl)-acetamid (XII)	100° ++)	-	λ_{max}=252	11000	λ_{max}=285	3140(ν_{N-OH})(breit) 1600 1610 ($\nu_{C=O}$) 1633
N-Hydroxy-N-(2-naphthyl)-acetamid (XV)	65-66° +++)	76-78° 6)	λ_{max}=331 λ_{infl}=312 λ_{infl}=294 λ_{max}=285,5 λ_{infl}=279 λ_{infl}=253 λ_{max}=247	510 850 6910 9120 8420 28100 31300	λ_{max}=309 λ_{max}=273 λ_{max}=261	2890-3450(ν_{N-OH}) (breit) 1623 1640 ($\nu_{C=O}$)
N-Hydroxy-N-(4-sulfamoyl-phenyl)-acetamid (XXXIII)	226-227° ++++)	227-229,5° 8)	λ_{max}=267	17300	λ_{max}=314	3322(ν_{N-OH})(breit) 1668($\nu_{C=O}$)

+) umkristallisiert aus Benzol-Petroläther, ++) aus Benzol, +++) aus n-Hexan-Chloroform, ++++) aus Äthanol

Tabelle 12

UV-Absorptionsmaxima und molare Absorptionskoeffizienten sowie NMR-Absorptionen von Sulfanilamid und einigen seiner Derivate

Substanz	UV-Absorption in Methanol λ_{max}(nm)	ε	NMR-Absorption in Hexadeuterodimethylsulfoxid δ (ppm)
Sulfanilamid (XXVIII)	263	20400	D_2O-austauschbar: bei δ= 5,77 und 6,86 (je 2H); nicht austauschbar: 6,58 und 7,45 (4H, A_2B_2-System)
N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-hydroxyl-amin (XXIX)	262,5		D_2O-austauschbar: bei δ= 7,00 (2H); 8,58 (1H, d, J= 3,5 cps) und 8,80 (1H, breit); nicht austauschbar: 6,88 und 7,60 (4H, A_2B_2-System)
N-(4-Sulfamoyl-phenyl)-oxamin-säure (XXXII)	268,5	17100	D_2O-austauschbar: bei δ= 7,24 (2H7 und 10,68 (1H, breit); nicht austauschbar: 7,73 und 7,97 (4H, A_2B_2-System)
N-(4-Aminobenzol-sulfonyl)-acet-amid (XXXIV)	271	19000	D_2O-austauschbar: bei δ= 6,10 (2H) und 11,50 (1H, breit); nicht austauschbar: 1,87 (3H, s); 6,62 und 7,54 (4H, A_2B_2-System)
N-(4-Acetylamino-benzolsulfonyl)-acetamid (XXXV)	261,5	24500	D_2O-austauschbar: bei δ= 10,36 (1H) und 11,92 (1H, breit); nicht austauschbar: 1,92 und 2,10 (je 3H, s); 7,80 (4H, A_2B_2-System)
4-Amino-3-Hydro-xybenzolsulfon-amid (XXXVI)	296 262	6450 11400	D_2O-austauschbar: bei δ= 5,16 und 6,85 (je 2H); 9,54 (1H); nicht austauschbar: 6,63 (1H, d, J= 7 cps); 7,06 (1H, q, J= 7u. 2 cps) und 7,10 (1H, d, J= 2 cps)

F.2. Methoden der Untersuchungen

Männliche Kaninchen (Gewicht 2500 - 4000 g) erhielten 50 mg/kg der Substanz entweder suspendiert in einer Lösung von 0,25% Agar und 0,9% Kochsalz i.p. oder in dünndarmlöslichen Gelatinekapseln per os verabreicht. Die Tiere wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten und hatten Trockenfutter und Wasser beliebig zur Verfügung. Der Urin wurde in 24 Stunden-Portionen gesammelt und sogleich aufgearbeitet oder bei -15° eingefroren.

In einem Versuch mit Sulfanilamid an einem 27-jährigen Mann von 75 kg wurden 1500 mg nicht markiertes und 9,0 mg ^{35}S-markiertes Sulfanilamid verabreicht.

Die Untersuchung der Stoffwechselprodukte im Harn erforderte folgende Arbeitsgänge:

a) Spaltung eventueller Konjugate (Glucuronidase bzw. Sulfatase) durch Inkubation mit ß-Glucuronidase bzw. Aryl-Sulfatase.

b) Extraktion der Umsetzungsprodukte

c) Trennung der Extrakte und Reinigung der Metabolite

d) Isolierung und Identifizierung

e) Quantitative Bestimmung.

Bei der Aufarbeitung der Metabolite des Sulfanilamids (von Mensch und Kaninchen) wurde ausserdem noch der Harn untersucht, der nach den Extraktionen verblieb, und dessen Radioaktivität sich durch weitere Extraktionen nicht mehr hatte verringern lassen.

a) Zur Spaltung der Konjugate wurde eine Harnprobe - 100 ml beim ersten qualitativen Versuch - 6 Stunden bei pH 6,8 mit ca. 30 E Sigma ß-Glucuronidase/ml Harn inkubiert. Nach Extraktion der freigesetzten Metabolite wurde weitere 6 Stunden mit 0,5 ml ß-Glucuronidase-Aryl-Sulfatase Boehringer/100 ml Harn bei pH 6,2 bzw. 1 Amp.

Suc d'Helix pomatia (ß-Glucuronidase, Sulfatase) je loo ml bei pH 5,2 inkubiert. Nach erneuter Extraktion wurde nochmals, wie bei Beginn, mit ß-Glucuronidase Sigma 6 Stunden inkubiert und aufgearbeitet. Weitere Inkubationen und Extraktionen sowie längere Inkubationszeiten wurden dann angewandt, wenn sie zu erhöhter Ausbeute an Metaboliten führten.

b) Die Umsetzungsprodukte wurden durch viermaliges Ausschütteln mit etwa dem gleichen Volumen Äther bei pH 6,o, in den Versuchen mit Sulfanilamid (XXVIII)bzw. N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid (XXX) mit Äthylacetat, extrahiert. Dann wurde der Urin auf pH 1,7 eingestellt und dreimal mit dem gleichen Extraktionsmittel, wie zuvor, ausgeschüttelt.

Dieser zweite Extrakt wurde bei den Versuchen mit N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamid (X), N-(4-Biphenylyl)-acetamid (IV) und N-(2-Naphthyl)-acetamid (XIII) auf ein kleines Volumen eingeengt, mit 1/3o dieses Volumens an gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und mehrere Tage bei 4°C stehengelassen, um Oxaminsäure als Na-Salz auszufällen.

Bei den Versuchen mit N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid bzw. Sulfanilamid wurde dieser Extrakt (pH 1,7), der die N-(4-Sulfamoylphenyl)-oxaminsäure (XXXII) enthielt, in gleicher Weise weiterverarbeitet wie der bei pH 6,o gewonnene Extrakt.

c) Zur Entfernung der N-Hydroxy-N-arylacetamide und Phenole aus dem bei pH 6 gewonnenen Extrakt wurde dieser auf etwa 3oo ml eingeengt und fünfmal mit je lo ml o,5 n NaOH extrahiert. In den Versuchsreihen mit N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid bzw. Sulfanilamid wurde dieser Reinigungsschritt weggelassen.

c.1) Zur Auftrennung der Metabolite in der organischen Phase wurde diese unter vermindertem Druck verdampft oder der Rückstand in wenig Methanol bzw. Methanol und Chloroform aufgenommen und auf DC-Platten (4o cm breit, beschichtet mit Kieselgel Merck PF_{254} in o,5 mm Dicke) aufgetragen. Entwickelt wurde mit Mischungen von Chloroform: Methanol (8o:2o bis 95:5), beim N-(4-Biphenylyl)-acetamid- und N-(4-Cyclohexylphenyl)-acetamidversuch mit Cyclohexan: Äthylacetat (7o:3o) und zur Trennung von N-(4-Sulfamoylphenyl)-acetamid von seinem N-Hydroxyderivat bzw. zur Trennung von N-(4-Sulfamoylphenyl)-glycolamid (XXXI) von N-(4-Acetylaminobenzolsulfonyl)-acetamid (XXXV) mit einer Mischung von Äthylacetat:Methanol:5o% Essigsäure (8o:5o:1). Zur Lokalisierung der entsprechenden Zonen wurden am Plattenrand das betreffende Arylamin, das N-Arylacetamid und das N-Arylglykolamid aufgetragen. Die erste Trennung war unvollkommen. Die einzelnen Zonen wurden nach Eluierung mit Methanol noch einmal oder mehrmals chromatographiert. Bei den Versuchen mit ^{35}S-markiertem Sulfanilamid wurde mit dem Dünnschicht-Scanner II, Berthold, bestimmt, welche Zonen radioaktives Material enthielten.

c.2) Zur Auftrennung der mit Lauge dem Äther- bzw. Äthylacetatextrakt entzogenen Metabolite wurde deren alkalische Lösung mit konz. HCl auf pH 6,o eingestellt und viermal mit etwa dem gleichen Volumen Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde verdampft und der Rückstand ebenfalls dünnsichtchromatographisch aufgetrennt. Zur Auffindung der N-Hydroxy-N-aryl-acetamide wurden die synthetischen Verbindungen ebenfalls aufgetragen. Entwickelt wurde mit Benzol: Äthanol (19:1) oder Chloroform:Methanol-Gemischen, wie oben.

d) Zur Isolierung des Metaboliten wurde dieser mit Methanol p.a. vom Kieselgel eluiert und nach Verdunsten des Methanols aus dem gleichen Lösungsmittel wie die synthet.Substanz

umkristallisiert, soweit die Ausbeute eine Kristallisation ermöglichte.

Die N-Hydroxy-N-arylacetamide waren auf diese Weise nicht kristallisierbar. Sie wurden daher durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten alkoholischen Cu^{II}-acetat-Lösung zur konzentrierten Lösung der Metabolite in Alkohol in Kupferkomplexe überführt, die nach einiger Zeit in der Kälte auskristallisierten.

Einige Metabolite konnten erst nach Reinigung über Sephadex LH-2o (Quell- und Elutionsmittel Methanol) identifiziert bzw. kristallisiert werden.

Die Identifizierung des kristallisierten Metaboliten wurde durch Vergleich von R_F-Werten, UV- und IR-Spektren mit der entsprechenden synthetisierten Substanz durchgeführt.

Die physikalischen Daten sind bei der Beschreibung der Synthese angegeben.

Von den Metaboliten, von denen kein IR-Spektrum aufgenommen werden konnte, wird das UV-Spektrum zusammen mit dem der synthetisierten Substanz gezeigt.

e) Die Menge der isolierten Metabolite wurde aus dem quantitativen UV-Spektrum errechnet.

Zur Ermittlung der im Harn verbliebenen Konzentrationen wurden die Verluste bei der Isolierung bestimmt. Dazu wurden die synthet. Substanzen in der etwa gleichen Konzentration, in der sie im Urin als Stoffwechselprodukt bestimmt worden waren, zu loo ml Urin gegeben und allen Operationen der Isolierung und Reinigung der Metabolite unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Die Werte (in Tab.7) der Substanzen, die nicht als Stoffwechselprodukte nachgewiesen werden konnten, geben einen

Anhaltspunkt dafür, in welcher Konzentration diese Stoffe nachweisbar sind. Bei der Isolierung und Bestimmung von Hydroxamsäuren treten viel größere Verluste ein als bei der Bestimmung der Glykolamide. Durch Zusatz der freien Metabolite zum Harn lassen sich die bei der Inkubation mit Konjugat-spaltenden Enzymen eintretenden Verluste nicht genau ermitteln.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. Andersen,R.A., Enomoto,M., Miller,J.A. and Miller,E.C., Cancer Res. 24, 128 (1964)

2. Arcos,J.C. and Argus,M.F., Adv.Cancer Res. 11, 403 (1968)

3. Arrhenius,E., FEBS symposium,Academic Press, London and New York, 16, 209 (1969)

4. Bonser,G.M., Boyland,E., Busby,E.R., Clayson,D.B., Grover,P.L. and Jull,J.W., Brit.J.Cancer 17, 127 (1967)

5. Boyer,F., Saviard,M. et Dechavassine,M., Ann.Inst.Past. 90, 339 (1956)

6. Boyland,E. and Manson,D., Biochem.J. 101, 84 (1966)

7. Boyland,E., Manson,D. and Nary,R., Ann.Rept.brit.Empire Cancer Camp. 38, Pt II, 53 (1960)

8. Bratton,A.C., White,H.J. and Marshall jr.,E.K., Proc.Soc.Exp.Biol. and Med. 42, 847 (1939)

9. Brodie,B.B. and Axelrod,J., J.Pharmacol. 94, 29 (1948)

10. Clayson,D.B., Brit.J.Cancer 7, 460 (1953)

11. Cramer,J.W., Miller,J.A. and Miller,E.C., J.biol.Chem. 235, 885 (1960)

12. Daly,J.W., Guroff,G., Udenfriend,S. and Witkop,B.,
Biochem.Pharmac. 17, 31 (1968)

13. Daudel,R. and Pullmann,A.,
Compt.rend. 220, 599 (1945)

14. Enomoto,M., Lotlikar,P., Miller,J.A. and Miller,E.C.,
Cancer Res. 22, 1336 (1962)

15. Friedländer,
Fortschritte Teerfarben, 9, 148 (1911)

16. Fries,W., Kiese,M. and Lenk,W.,
im Druck (1971)

17. Fries,W., Kiese,M. and Lenk,W.,
in Vorbereitung (1971a)

18. Gelmo,P.,
J.prakt.Chemie, (2) 77, 371 (1908)

19. Graebe,C.,
Ber.dtsch.chem.Ges. 35, 43 (1902)

20. Graebe,C. und Rostovzeff,S.,
Ber,dtsch.chem.Ges. 35, 2751 (1902)

21. Heinze,E., Hlavica,P., Kiese,M. and Lipowsky.G.,
Biochem.Pharmac. 19, 641 (1970)

22. Heubner,W.,
Arch.exp.Path.Pharmak. 72, 241 (1913)

23. Holzer,W. und Kiese,M.,
Archexp.Path.Pharmak. 251, 222 (1965)

24. Hübner,H. und Osten,A.,
Liebigs Ann.Chem. 209, 334 (1881)

25. Irving,C.C.,
Cancer Res. 22, 867 (1962)

26. Jagow,R.von, Kiese,M. and Lenk,W.,
Arch.exp.Path.Pharmak. 260, 148 (1968)

27. Jagow,R.von, Kiese,M. and Lenk,W.,
Biochim.Biophys.Acta 158, 45 (1968)

28. Jagow,R.von, Kiese,M. and Renner,G.,
Biochem.Pharmac. 15, 1899 (1966)

29. Kiese,M.,
Arch.exp.Path.Pharmak. 235, 354 (1959)

30. Kiese,M.,
Arch.exp.Path.Pharmak. 235, 360 (1959)

31. Kiese,M.,
Pharmac.Rev. 18, 1091 (1966)

32. Kiese,M. and Lenk,W.,
Biochem.Pharmac. 18, 1325 (1969)

33. Kiese,M. and Lenk,W.,
Biochim.Biophys.Acta, 222, 549 (1970)

34. Kiese,M. and Lenk,W.,
Biochem.Pharmac. 20, 379 (1971)

35. Krisch,K. und Staudinger,Hj.,
Biochem.Z. 334, 312 (1961)

36. Kursanoff,N.,
Liebigs Ann.Chem. 318, 324 (1901)

37. Liebermann,C. und Scheiding,F.,
Liebigs Ann.Chem. 183, 267 (1876)

38. Mayes,H.A. and Turner,E.E.,
J.Chem.Soc. 1929, 500

39. Milhaud,G., Aubert,J.P. et Boyer,F.,
Compt.rend. 240, 2090 (1955)

40. Miller,E.C., Cooke,C.W., Lotlikar,P.D. and Miller,J.A.,
Proc.Am.Ass. Cancer Res. 5, 45 (1964)

41. Miller,E.C., Lotlikar,P.D., Pitot,H.C., Fletcher,T.L.
and Miller,J.A.,
Cancer Res. 26, 2239 (1966)

42. Miller,E.C., Miller,J.A. and Hartmann,H.A.,
Cancer Res. 21, 815 (1961)

43. Miller,J.A., Cramer,J.W. and Miller,E.C.,
Cancer Res. 20, 950 (1960)

44. Miller,J.A., Wyatt,C.S., Miller,E.C. and Hartmann,H.A.,
Cancer Res. 21, 1465 (1961)

45. Poirier,L.A., Miller,J.A. and Miller,E.C.,
Cancer Res. 23, 790 (1963)

46. Posner,H.S., Mitoma,S. and Udenfriend,S.,
Arch.Biochem.Biophys. 94, 269 (1961)

47. Smith,W.R.D. and Baldwin,R.W.,
Ann.Rept.brit.Empire Cancer Camp. 40, Pt II, 431 (1962)

48. Thauer,R.K., Stöffler,G. und Uehleke,H.,
Arch.exp.Path.Pharmak. 252, 32 (1965)

49. Thorpe,W.V. and Williams,R.T.,
Biochem.J. 35, 61 (1941)

50. Weisburger,E.K. and Weisburger,J.H.,
Adv.Cancer Res. 5, 331 (1958)

51. Weisburger,J.H., Grantham,P.H., Vanhorn,E.,
Steigbigel,N.H., Rall,D.P. and Weisburger,E.K.,
Cancer Res. 24, 475 (1964)

52. Williams,R.T.,
Biochem.J. 40, 219 (1946)

53. Williams,R.T.,
Biochem.J. 41, 1 (1947)

54. Williams,R.T.:Detoxication mechanisms. Chapmann and Hall Ltd., London, 1959.

55. Williams,R.T. and Ansell,J.,
Biochem.J. 39, LXIII(1945)

LEBENSLAUF

Am 12. Oktober 1942 wurde ich in Frankfurt am Main geboren. Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule, zunächst in Hofheim am Taunus, dann in Aschaffenburg am Main. 1953 trat ich in das Humanistische Gymnasium Aschaffenburg ein und legte dort 1962 das Abitur ab.

Von der Freien Universität Berlin erhielt ich einen Studienplatz und belegte dort im Wintersemester 1962/63 Chemie und Botanik. Vom April 1963 bis März 1965 leistete ich die pharmazeutische Praktikantenzeit ab, im ersten Jahr in der Apotheke des Westend-Krankenhauses, Berlin-Charlottenburg, im zweiten Jahr in einer öffentlichen Apotheke in Berlin-Wilmersdorf. Nachdem sich daran anschliessenden pharmazeutischen Vorexamen studierte ich vom Sommersemester 1965 an Pharmazie an der Universität Würzburg. Im Frühjahr 1968 legte ich dort die pharmazeutische Prüfung ab.

Nach einigen Monaten Kandidatenzeit begann ich im Oktober 1968 am Pharmakologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Kiese meine Promotionsarbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. M. Kiese und Herrn Prof. Dr. H.-D. Stachel für ihr freundliches Wohlwollen, mir die Durchführung dieser Arbeit am Pharmakologischen Institut der Universität zu ermöglichen sowie für ihren Rat, ihre Anleitungen und ihre Förderungen bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. W. Lenk danke ich sehr dafür, dass er den Fortgang der Arbeit kritisch verfolgte und dass er jederzeit in sehr entgegenkommender Weise bereit war, Hinweise zu geben und auftauchende Fragen zu besprechen.

Frl. G. Schild und Frl. E. Seifert vom Max-Planck-Institut für Biochemie, München, nahmen mir freundlicherweise die IR- und NMR-Spektren auf.